FACULTE MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

N° 1

Sur les phosphatases animales acides.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU SYSTÈME PHOSPHATASIQUE DES HÉMATIES

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE
Le *1943*
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

PAR

JOSETTE BAUDOIN
LICENCIÉE ÈS SCIENCES
née le 3 mai 1918, à Nice (Alpes-Maritimes).

Examinateurs de la Thèse : MM. J. ROCHE, *Président.*
NICLOUX, *Prof. Fac. Méd. Strasbourg.*
P. DUBOULOZ. *Professeur.*
ARNOUX, *Agrégé.*
Assesseurs.

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1943

FACULTE MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

N° 1

Sur les phosphatases animales acides.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU SYSTÈME PHOSPHATASIQUE DES HÉMATIES

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE
Le *1943*
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

PAR

JOSETTE BAUDOIN
LICENCIÉE ÈS SCIENCES
née le 3 mai 1918, à Nice (Alpes-Maritimes).

Examinateurs de la Thèse : MM. J. ROCHE, *Président.* — NICLOUX, *Prof. Fac. Méd. Strasbourg.* — P. DUBOULOZ, *Professeur.* — ARNOUX, *Agrégé.* — *Assesseurs.*

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1943

R UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

PERSONNEL DE LA FACULTÉ MIXTE

DE

MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Doyen : Lucien CORNIL *Assesseur :* F. MERCIER

Doyen honoraire : L. IMBERT

Professeurs honoraires : MOITESSIER, CASSOUTE
OLMER, GAUJOUX, COTTE, AUBARET

Chargé de cours honoraire : TIAN.

Secrétaire : J. COMTE *Bibliothécaire :* Mme PEROL.

Professeurs :

Anatomie	CORSY
Anatomie pathologique et Pathologie expérimentale	CORNIL
Bactériologie	ROUSLACROIX
Chimie analytique et hydrologie	RIMATTEI
Chimie médicale	ROCHE
Clinique chirurgicale	FIOLLE
Clinique chirurgicale	BOURDE
Clinique exotique	HECKENROTH
Clinique des maladies nerveuses	ROGER
Clinique médicale	AUDIBERT
Clinique médicale	MONGES
Clinique médicale	MATTEI
Clinique médicale infantile	GIRAUD
Clinique obstétricale	VAYSSIÈRE
Clinique ophtalmologique	JAYLE
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique	BREMOND
Clinique urologique	CHAUVIN
Histoire naturelle	N...
Histologie	ROMIEU
Hygiène générale et coloniale	VIOLLE
Médecine légale	MOSINGER
Parasitologie	JOYEUX
Pathologie chirurgicale	MOIROUD
Pharmacodynamie et matière médicale	MERCIER
Pharmacie	VIGNOLI
Physiologie	N...
Physique	CHEVALLIER
Thérapeutique	POINSO
Professeur sans chaire	POURSINES
Professeur sans chaire	DUBOULOZ
Professeur sans chaire	SAUTET

Chargés de cours :

Clinique dermatologique ..... VIGNE
Hydrologie thérapeutique ..... PIERI

Agrégés en exercice :

MM. BERTHIER	MM. CHOSSON	MM. AUDIER
BALANSARD	DELPHAUT	DOR
BRAHIC	R. IMBERT.	RECORDIER
FIGARELLA	PAILLAS	SALMON
ARNOUX		

Chargés des fonctions d'agrégé :

Chimie médicale ..... DERRIEN
Physiologie ..... DONNET

Chargés de Cours complémentaires :

Anatomie descriptive et topographique ..... SALMON
Chimie minérale ..... ARNOUX
Chimie organique ..... DUMAZERT
Clinique de la tuberculose ..... BERTHIER
Clinique des maladies contagieuses ..... PERIOT
Clinique chirurgicale infantile ..... R. IMBERT
Clinique stomatologique ..... ACHARD
Clinique gynécologique ..... FIGARELLA
Médecine opératoire ..... DOR
Microbiologie (Pharmacie) ..... BOYER
Neuro-Chirurgie ..... ARNAUD
Obstétrique ..... CHOSSON
Pharmacodynamie (Pharmacie) ..... DELPHAUT
Psychiatrie ..... ALLIEZ
Toxicologie ..... GUILLOT

A MES PARENTS

A MON FIANCÉ

A MON MAITRE

Monsieur le Professeur J. ROCHE.

membre correspondant de l'académie de médecine

qui trouvera ici le gage de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur M. NICLOUX.

membre correspondant de l'institut de france
membre associé de l'académie de médecine

qui depuis deux années est pour mes camarades et moi un vivant exemple.

A Monsieur le Professeur DUBOULOZ.

ET

A Monsieur le Professeur Agrégé M. ARNOUX.

dont l'enseignement de physique et de chimie générale me permirent d'aborder un travail de recherches.

A mes Camarades du Laboratoire de Chimie Biologique.

en particulier a M. Nguyen-van THOAI,

en souvenir de notre amicale collaboration.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547003_0105

PREMIÈRE PARTIE.

Introduction.

I. Définition et classification des phosphatases.

Les processus physiologiques les plus importants : contraction musculaire, fermentations, digestion, oxydations, oxydo-réductions mettent en jeu des catalyseurs spécifiques doués d'une très grande activité : les diastases ou enzymes. Parmi ceux-ci les phosphatases, signalées pour la première fois en 1907 par les biologistes Japonais Suzuki, Yoshimura et Takaishi [70], participent à toutes les réactions biologiques de synthèse et de dédoublement des esters phosphoriques et des dérivés pyrophosphoriques, très répandus dans les règnes animal et végétal. La présence de ces enzymes a été établie dans presque toutes les cellules des animaux, des végétaux supérieurs, des moisissures et des bactéries.

La spécificité des phosphatases vis-à-vis de divers substrats a permis à Folley et Kay [30] d'en établir une classification basée sur la nature des corps qu'elles hydrolysent. Ces enzymes ont été répartis en six groupes :

1. Les phosphomonoestérases, qui hydrolysent tous les monoesters de l'acide orthophosphorique ;

2. Les phosphodiestérases, qui sont actives sur les diesters de l'acide orthophosphorique mais n'attaquent qu'une seule liaison du diester ;

3. Les pyrophosphatases, qui agissent sur les sels ou les diesters symétriques de l'acide pyrophosphorique ;

4. Les métaphosphatases, qui hydrolysent les sels de l'acide métaphosphorique ;

5. Les phosphoamidases, qui dédoublent les acides amidophosphoriques ;

6. Enfin le dernier groupe est celui des phosphatases, spécifiques d'un seul substrat, n'entrant pas dans les catégories précédentes. Il comprend : la lécithase, la phytase, l'adénylpyrophosphatase, l'hexosediphosphatase. L'existence de ces phosphatases en tant qu'enzymes actifs rigoureusement sur un unique ester ne peut actuellement être admise sans réserve.

Parmi celles hydrolysant les monoesters de l'acide orthophosphorique, qui sont les plus importantes et les plus répandues, Folley et Kay distinguent quatre types principaux en se basant sur leur pH optimum d'action, leur aptitude à dédoubler préférentiellement l'un des isomères α ou β de l'acide glycérophosphorique et leur sensibilité vis-à-vis de l'ion Mg^{++}.

Le type A_1 ou phosphatase « alcaline », de pH optimum voisin de 9, hydrolyse plus activement le β que l'α-glycérophosphate de sodium et Mg^{++} renforce son action. On le rencontre dans les os, le foie, les reins, la muqueuse intestinale, la glande mammaire, les globules blancs et rouges du sang. L'étude de cette phosphatase, sans être complète puisqu'elle n'a pas encore pu être isolée à l'état pur, n'en est pas moins déjà très approfondie grâce aux travaux de Robison et de Kay et de nombreux auteurs. De récentes recherches viennent de lui être consacrées par S. de Laromiguière [47] et A. Laurens [46].

Le type A_2 ou phosphatase « acide », de pH optimum 4,5-5,5, (Bamann et Riedel [12], Kutscher [43], Giri [31]) insensible aux ions Mg^{++}, dédouble préférentiellement l'α-glycérophosphate de sodium. Il a été signalé dans le foie et la rate (Davies [26]), dans divers organes des

végétaux supérieurs (Courtois [22]) dans les champignons (Nguyen-van Thoai [54]), dans le son de riz (Uzawa [73]). Son caractère acide nous donnera du reste l'occasion de nous étendre plus longuement à son sujet.

Le type A_3 ou phosphatase « très acide », de pH optimum 3-4, est inhibé par l'ion Mg^{++} ; son comportement vis-à-vis des glycérophosphates est variable et nous aurons par la suite à discuter ce point. On le rencontre dans la takadiastsae (Kobayashi [40], Asakawa [6], Hori [35]) les champignons (Nguyen-van Thoai [54]) et les organes animaux (Bamann [14]). Le type A_4, phosphatase de pH optimum 6-6,4, est activé par l'ions Mg^{++} ; il dédouble beaucoup plus rapidement l'isomère α- que le β-glycérophosphate de sodium. Décrit d'abord dans les hématies par Roche [58], puis dans la levure basse par Schäffner et Bauer [66] il a été étudié par la suite dans les hématies par Roche et Bullinger [60].

Toutefois cette classification ne saurait être considérée que comme approchée ; en fait le pH optimum de l'enzyme A_4 varie de 5,4 (Hashimoto [34], Hori [35]) à 6-6,4 (Roche et Bullinger [60]) dans les hématies des divers animaux ; celui de la phosphatase A_3, des organes animaux et végétaux, dite « très acide », dépend du taux des inhibiteurs naturels accompagnant l'enzyme (Bamann et Salzer [14]), Kobayashi [40] Inouye [26]) ; il est compris entre pH = 3,2 et pH = 4,4. Quant à l'ion Mg^{++}, il se comporte comme activateur de l'enzyme A_4 des hématies (Roche et Bullinger [60]) et des levures basses (Schäffner et Krummey [67]), mais il est inhibiteur de la phosphatase A_3 (Nguyen-van Thoai [54]) ou sans action sur elle (Bamann [7]). L'enzyme A_2 de pH optimum 5-5,6, en général inhibé par l'ion Mg^{++} (Courtois [22], Davies [26], Nguyen-van Thoai [54]), peut être activé par lui (Knœvenagel [39], Munemura [53]) ou être insensible à sa présence (Bamann et ses collaborateurs Giri [31] Cedrangolo [18]). De même, l'inhibition énergique exercée

par l'ion Mg^{++} sur la phosphatase A_3 « très acide » des levures (Albers [3]), des basidiomycètes (Nguyen-van Thoai [54]) n'est observée sur l'enzyme de même pH optimum, ni dans la takadiastase ni dans les tissus maux (Bamann, Munemura). Enfin il semble que l'action préférentielle sur l'un des glycérophosphates de sodium ne constitue pas un caractère absolu des diverses phosphatases acides. La plus grande affinité de l'enzyme A_4 des hématies (Roche [58]) des levures basses (Schäffner et collaborateurs) et de celle de la takadiastase A_3 (Bamann) vis-à-vis de l'α-glycérophosphate de sodium peut être altérée par l'extraction (Shuchardt [69]) ou la dialyse (Hashimoto [34]). De même, la phosphatase A_2, de pH optimum 5-5,6, hydrolyse plus énergiquement l'isomère β que l'α dans les organes animaux (Bamann), tandis que son comportement est inverse dans les feuilles d'amandier (Courtois [22]).

En ce qui concerne les pyrophosphatases, une classification plus simple a seule été envisagée, ces enzymes ne pouvant être différenciés que par leur pH optimum d'action. Selon Takahashi [71] et Munemura [53] il y aurait trois pyrophosphatases de pH optimum respectif à pH = 4 et pH = 5,5, dans divers tissus végétaux (Courtois [22], Nguyen-van Thoai [55]) et animaux (Bamann et Gall [10]), et à pH = 8, cette dernière étant plus répandue dans les organes animaux où sa répartition est parallèle à celle de la monoestérase. Toutefois il existe dans les levures une pyrophosphatase de pH optimum 6,4 décrite par Bauer.

II. — Constitution des phosphatases.

On considère avec von Euler, à la suite des hypothèses de G. Bertrand, de Willstätter que les enzymes sont formés par l'union de deux constituants. L'un de ceux-ci, le coenzyme de nature relativement simple est porteur de groupements actifs catalysant spécifique-

ment une réaction ; c'est ainsi que divers enzymes oxydants contiennent un coenzyme dans lequel est présent un métal pouvant exister sous forme oxydée ou réduite ($Fe^{III} + \varepsilon^- \rightleftharpoons Fe^{II}$; $Cu^{II} + \varepsilon^- \rightleftharpoons Cu^{I}$ par exemple). L'autre constituant de l'enzyme ou apoenzyme est toujours une protéine, également spécifique ; il participe à la fixation du substrat et c'est sur les modifications de son affinité ou celui-ci que repose l'action de certains inhibiteurs dits pour cette raison « concurrents ». L'union du coenzyme et de l'apoenzyme donne naissance à l'holoenzyme tel qu'il existe dans la nature et qu'il a parfois pu être isolé à l'état de pureté (pepsine, trypsine, ferment jaune, catalase).

Aucune phosphatase pure n'a été préparée jusqu'ici, mais il a été néanmoins possible de poursuivre des recherches sur la constitution de ces enzymes. On s'est surtout adressé pour cela aux phosphatases d'optimum d'action alcalin, actives sur les esters ; mais il est possible, sinon probable, que les résultats obtenus soient d'une portée générale. Voici selon Albers [4] quels sont les principaux : La molécule enzymatique ou holophosphatase se forme par une réaction d'équilibre entre un constituant de poids moléculaire bas, la cophosphatase, groupement actif ou porteur de groupements actifs, et l'apophoshpatase, protéine spécifique de poids moléculaire élevé :

(1) Cophosphatase + Apophosphatase $\rightleftharpoons$ Holophosphatase (2)

Les données expérimentales fournies par Albers [4] sur l'existence de cette réaction d'équilibre sont les suivantes :

Dans le sens (1) : L'inactivation irreversible provoquée par une dialyse prolongée, fournissant un produit d'une très grande pureté, montre que la stabilité de l'enzyme, conditionnée par le pH, est liée à une dissociation de l'holoferment en ses constituants. L'inactivation de la phosphatase rénale par conservation à pH acide n'est pas liée à la durée d'action de l'acide où la nature du

ferment, mais au degré d'acidité ; elle a tous les caractères d'une réaction d'équilibre. La réactivation par retour au pH optimum d'action est possible lorque l'inactivation n'a pas été faite dans un milieu trop acide ; elle est irréversible à pH = 3. Cette phosphatase semble présenter une dissociation préférentielle à un pH déterminé et il est vraisemblable que la charge de l'holoferment est déterminante pour cette dissociation.

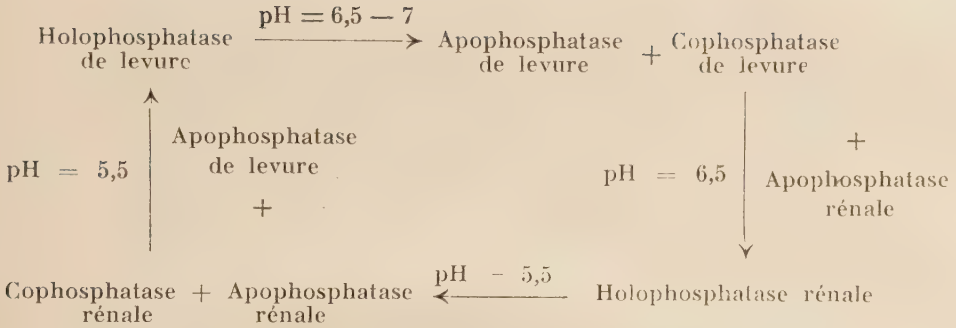
Dans le sens (2) : La forme indissociée est active et la dialyse en milieu acide (c'est-à-dire au pH de dissociation de l'enzyme) permet de séparer le coferment de l'apoferment. Ce dernier est activable par des coferments provenant d'autres phosphatases. La lenteur des réactions d'inactivation (par modification du pH ou par dialyse) et de reconstitution de l'enzyme à partir de ses constituants semble devoir exclure que les deux constituants soient liés par des combinaisons de valence du type de celles de la chimie minérale. Toutefois de telles combinaisons peuvent exister si la lenteur des réactions observées provient de la vitesse de dénaturation de l'apoenzyme.

La spécificité d'action de ces enzymes, à savoir la propriété d'hydrolyser dans diverses conditions les esters de l'acide phosphorique, est donc due à des apoferments différents pour les coferments identiques. Ceci permet de conclure, en analogie avec ce qui a été constaté dans le système des déhydrases, sur lequel nous disposons d'une documentation étendue, qu'un système enzymatique possède une spécificité d'action liée au groupement actif contenu dans le coferment, tandis que sa spécificité envers le substrat dépend des différents apoferments. L'exemple des phosphatases nous apprend, en outre, que la spécificité du pH optimum dépend de l'apoferment, donc est une caractéristique qui va de pair avec la spécificité du substrat. Il apparaît comme probable que la diversité des pH optima des phosphatases est liée à la diversité des apoferments plus qu'à celle des coferments. La multiplicité des phosphatases

permet d'étendre ces considérations théoriques en ce qui concerne l'apoferment [5] : de même qu'en physiologie la notion de protéine spécifique joue un rôle important on pourra parler, par analogie, d'« apoferment spécifique. » On sait, à propos des apoferments purifiés que ce sont des protéines parfois cristallisables (pepsine, trypsines, uréase, ribonucléase). Sans parler du cas particulier des phosphatases qui sont très variées, si l'on pense aux protéases isolées sous forme pure, cristallisée, des différents animaux et au cas particulier de la catalase, comment expliquer que cet enzyme qui, dans les divers organes d'un même animal présente une affinité différente par rapport à son substrat, H_2O_2, ne voit pas varier malgré cela le mécanisme de la réaction catalasique ni la spécificité de pH ? La notion d'« apoferment spécifique » [5] permet d'interpréter ces différences de comportement beaucoup plus facilement que si l'on suppose l'existence d'impuretés ou la formation de symplexes, notion que l'on ne saurait maintenir quand il s'agit de ferment cristallisé. On peut supposer une spécificité d'organe pour l'apoferment. Cette notion prévoit que les ferments provenant de différents organes du même animal peuvent être très semblables, mais que les différences plus fines qu'ils présentent doivent être rapportées à des différences de spécificité dans les apoferments.

Déplacement du co-ferment : on peut imaginer que l'on trouve à côté d'une phosphatase spécifique, agissant aux pH alcalins, en plus de son propre apoferment, l'apoferment d'une ou plusieurs autres phosphatases. Dans des conditions normales cet apoferment n'apparaît pas puisqu'il lui manque le co-ferment nécessaire pour manifester son activité. Mais le cas peut survenir où cette holophosphatase cède sa cophosphatase au deuxième apoferment et qu'il se forme ainsi une nouvelle phosphatase qui apparaît avec ses caractéristiques propres. Pareils déplacements de coferment se constatent en fait et leur étude, très riche en conclusions, est

très importante pour l'étude des phosphatases et des autres groupes fermentaires : Albers [4] mélange à pH = 9, l'apophosphatase rénale et la phosphatase de la levure basse dont le pH optimum d'action est 4 et qui à pH = 9 est inactive ; il obtient ainsi une activité qui augmente avec le temps (après dix heures) mais qui n'atteint ni celle de la phosphatase rénale ni celle de la phosphatase acide, à leur optimum. Ceci est peut-être dû à une destruction de l'apoenzyme au cours des opérations. L'allure de la réaction de combinaison des deux composants est celle d'une réaction autocatalytique. La dialyse de la phosphatase rénale de pH optimum = 4,8 donne un coferment qu'on réunit à l'apophosphatase de pH optimum acide ; les mêmes phénomènes sont observés. La dissociation de l'holophosphatase en apophosphatase et cophosphatase observée dans le cas de la phosphatase alcaline du rein et dans celle de la levure haute acide permet par conservation de ces phosphatases à des pH différents d'établir des courbes de stabilité [5] des phosphatases en fonction du pH ; courbes qui sont différentes des courbes d'activité de pH. Ces courbes de stabilité montrent que la phosphatase alcaline s'inactive rapidement entre pH = 6 à 5 et la phosphatase acide, de pH optimum d'activité 4, entre pH = 8 et 6 et entre pH = 3,2 et 1,5. D'autre part, dans la zone d'inactivation rapide la dissociation de l'holophosphatase est possible, tandis qu'elle est très difficile dans les zones de stabilité de la phosphatase. La phosphatase de levure haute, placée aux pH alcalins en présence de la phosphatase rénale, perd alors son coferment, lequel s'unit à l'apophosphatase rénale pour donner une holophosphatase rénale. Inversement, quand l'holophosphatase rénale est maintenue à pH = 5 ou 6 elle cède son coferment à l'apoferment de l'enzyme de la levure et donne une holophosphatase de levure stable à pH = 5-6. On doit donc envisager le cycle :



Ces expériences montrent que les phosphatases employées possèdent le même coferment et il se pourrait que, d'une façon générale, les phosphatases de même spécificité possèdent le même coferment.

Le fait que le coferment peut passer d'un apoferment à un autre, rend les méthodes de préparation de ces enzymes d'autant plus délicates dans le cas de l'existence de phosphatases isodynames, et ceci, indépendamment du fait qu'il existe toujours dans les extraits un excès d'apoferment.

D. Albers [1], au moyen de la dialyse à un pH déterminé qui provoque une dissociation de la phosphatase rénale en ses constituants, constate que la partie non dialysable est une protéine, le liquide dialysé comportant deux facteurs : Mg^{++} (activateur selon Erdtmann ; coferment suivant Kay) qui n'est pas le coferment, et un autre corps qui est le véritable coferment ; le dialysat ayant perdu de l'activité est presque totalement réactivé par addition du liquide dialysé. Le dialysat activé par Mg^{++} est réactivé davantage encore par l'addition du liquide dialysé. Il convient par conséquent de rejeter l'hypothèse de H. Albers selon laquelle l'inactivation survenant au cours de la dialyse est dûe à l'élimination du magnésium. Il semble que Mg^{++} ne développe une action activante que sur l'holoenzyme. En aucun cas le magnésium seul ne réactive l'apoenzyme.

Cloetens poursuivant ces travaux arrive à une représentation plus complexe du système phosphatasique. Il étudie les deux phosphatases alcalines, qu'il distingue sous les noms de types I et II dans les organes animaux et montre, qu'à la partie protéique E sont liés deux groupements G_1 et G_2, qui peuvent se combiner à deux ions métalliques M_1 et M_2 [19]. De plus [20], il existerait un troisième groupement G_3, différent de G_1 et G_2, susceptible d'être bloqué par un métal, ce qui amènerait perte d'activité. On pourrait donc schématiquement représenter ainsi la phosphatase :

$$\begin{array}{l} \diagup G_1 - M_1 \\ E - G_2 - M_2 \\ \diagdown G_3 \end{array}$$

Par dialyse contre CO_3HNa et dilution, M_1 se détache de la phosphatase alcaline II, avec perte pour celle-ci de 98 p. 100 de son activité. M_1 peut être : Ca^{++}, Mg^{++}, Co^{++}, Ni^{++}, Mn^{++}. Par dialyse contre KCN, 10^{-2}M (pH = 9) on détache M_2 qui peut être : Zn^{++}, Co^{++}, Hg^{++}.

Les faits semblent prouver [21] que, lorsque M_2 est absent, M_1 se fixe non seulement sur G_1 mais sur G_2 et il en résulte une inhibition. Cette inhibition est « concurrente » lorsque M_2 est en faible concentration ; elle disparait lorsque la concentration de M_2 atteint une certaine valeur. Zn^{++}, Co^{++} et Hg^{++} ne semblent pas se fixer sur des molécules d'enzymes différentes ou sur des G_2 différents, car, après réactivation par l'un des métaux, l'addition d'un deuxième métal n'augmente pas l'activité.

Ayant admis ces théories, voici comment Massart et Dufait [51] expliquent l'inhibition par les fluorures : F^- agirait de plusieurs façons différentes : 1) par formation de complexes avec les métaux trivalents, tels Mn^{III} et Fe^{III}, le groupement actif des enzymes renfermant un métal. 2) par formation de complexe avec les métaux divalents, tels Mg^{II} . Dans les différents ferments l'inhibition par le fluorure de sodium est une preuve de plus de l'existence d'un métal dans la molécule de l'enzyme. Prenons un exemple :

La phosphatase alcaline du rein, activée par Mg^{++}, Co^{++}, Zn^{++} est inhibée par KCN, SH_2,

La phosphatase alcaline du foie, activée par Mg^{++}, est inhibée par FNa,

La phosphatase à pH = 6 de levure, activée par Mg^{++}, Mn^{++}, est inhibée par FNa,

La phosphatase très acide de levure, est simplement inhibée par FNa.

Or l'action des fluorures ne doit pas être interprêtée dans le cadre de la série d'Hofmeister (sinon les phosphatases activées par Mg^{++}, Co^{++}, Mn^{++} seraient inhibées identiquement) mais imputée à l'élimination des groupements métalliques. Ainsi, le fluorure de sodium s'unissant facilement au magnésium inhibe plus les phosphatases-Mg que celles à Co ou à Mn, et la phosphatase de levure doit être considérée comme une phosphatase-Mg. La phosphatase-Co sera inhibée par KCN, car le cyanure de potassium forme un complexe avec le cobalt. De même, l'action du cyanure de potassium sur les phosphatases alcalines rénales doit être rapportée pour ces auteurs à l'élimination d'un métal, et non à un bloquage de fonctions aldéhydiques ou cétoniques comme on pourrait le supposer ; l'hydroxylamine et la semicarbazide étant sans action. L'action de l'hydrogène sulfuré est de même nature [52] et le métal incriminé serait peut-être Zn dans le cas de la phosphatase alcaline rénale, ce qui est confirmé par les travaux antérieurs de Massart [52] et les conclusions de Cloetens [19] sur la phosphatase -Zn.

La phosphatase alcaline A_1 hépatique serait une protéine -Mg de même que la phosphatase de levure de pH optimum = 6. Massart et Dufait rejettent l'interprétation de Jung, selon laquelle l'activation par les métaux divalents est liée à une action sur leur support colloïdal. Et ils font remarquer que les inhibiteurs sont des corps ou des éléments de petit poids moléculaire (SH_2, CNK, FNa, Co, Cu) et que les ferments à petits groupements prosthétiques (métallique ou organique) agissent

sur des substrats de faible poids moléculaire, tandis que les ferments qui agissent sur des corps tels que les protéides, l'amidon, ne possèdent pas de groupements prosthétiques.

Albers [5], cherchant à expliquer la classification de Folley et Kay d'après les données modernes, constate que la distinction en quatre types basée sur le pH optimum, l'hydrolyse des α- et β-glycérophosphates, l'activabilité par Mg^{++}, repose sans doute sur des différences d'apoferments et doit être encore maintenue. Quant aux multiples contradictions que l'on rencontre encore, surtout pour les phosphatases « neutres » et « acides » elles seraient imputables aux déplacements de coferments et aux modifications possibles des apoferments.

III. Phosphomonoestérases acides (animaux et végétaux).

Notre travail étant consacré à l'étude des phosphatases acides, nous examinerons brièvement l'essentiel des connaissances actuelles à leur sujet.

Type A_4.

Existence : En 1924 les travaux de Martland, Hausman et Robison [50] signalent, pour la première fois, dans les globules rouges du sang, la présence d'une phosphatase dont ils fixent le pH optimum d'action « au voisinage de la neutralité » en milieu légèrement plus acide que la réaction du sang. Partant de ces données J. Roche [58] établit que l'enzyme des hématies présente un pH optimum variable suivant la nature du substrat : compris entre 6 et 6,2 pour les esters monophosphoriques (glycérophosphates, nucléotides, acides hexosemonophosphoriques) le pH peut varier de 5,8 avec le phénylphosphate jusqu'à 6,6-6,8 avec les esters diphosphoriques (acides fructosediphosphorique, diphosphoglycérique) ; il est plus actif sur l'α- que sur le β-

glycérophosphate de sodium, contrairement aux phosphatases alcalines. Depuis lors ces observations se sont trouvées confirmées par W. Hori [35], Davies [26] Schoonover [68] Hashimoto [34] et étendues par J. Roche et M. Latreille [31] aux hématies nuclées des oiseaux. Par ailleurs, un ensemble de recherches poursuivies par Schäffner et Bauer [66], Bauer [16], Schäffner et Krumey [67], Albers [3], Schuchardt [69] a établi que les levures renferment un système phosphatasique contenant un enzyme du même groupe, de pH optimum = 6,0, considéré par Folley et Kay comme identique à celui des hématies (phosphomonoestérase A_4).

Essais de purification : Afin de fixer de manière plus précise les propriétés de cet enzyme, des essais de purification ont été entrepris en 1931 par J. Roche [58] : précipitation de l'hémoglobine par le sulfate d'ammonium ou le chloroforme ; mais la solution restante après ou avant dialyse s'est révélée, dans le premier cas, tout à fait inactive, dans le second, peu active (20 p. 100 de l'activité initiale). L'adsorption de l'enzyme faite sur l'hydroxyde d'alumine, le kaolin, le kieselguhr, le carbonate de baryum et le sulfate de baryum s'est révélée également sans résultat satisfaisant. Enfin, en 1939, dans un travail plus général sur les activateurs et les inhibiteurs, J. Roche et E. Bullinger [60] devaient admettre que, s'il est adsorbable sur kaolin à un pH optimum de 6 cet enzyme ne peut être mis en élution et qu'il s'inactive totalement quand les adsorbats demeurent en suspension pendant trente minutes dans les solutions de pH = 9,5.

Action sur divers substrats : Utilisant alors simplement comme préparation de cet enzyme les globules laqués par leur volume d'eau distillée et en le faisant agir sur différents substrats, les données suivantes ont été établies [58] : il hydrolyse à un pH optimum de 6,2 (sang de cheval) plus facilement l'α- que le β-glycéro-

phosphate de sodium [26] [68] ; il est également plus actif sur le fructosediphosphate que sur le glucosemonophosphate. Dans les levures [66] cette phosphatase serait spécifiquement active sur le dérivé α du glycérophosphate de sodium et non sur le dérivé β ; active également sur les acides phosphoglycériques, hexosemonophosphoriques, monophénylphosphorique et non sur l'acide diphénylphosphorique, son pH optimum reste voisin de 6 sur ces divers substrats.

Activateurs et inhibiteurs : Le magnésium a été signalé comme activateur en 1931 par JENNER et KAY [37], dont les travaux furent confirmés trois ans plus tard par DAVIES [26] qui, observant au pH optimum 6 un renforcement de l'activité phosphatasique par l'ion Mg^{++}, note qu'en dessous de ce pH une légère inactivation se produit. En 1936, SCHOONOVER [68] étudie l'action de Mg^{++} sur les hématies laquées de sujets sains et cancéreux et il constate dans les deux cas une activation de l'action diastasique par le magnésium, celui-ci étant plus faiblement activateur sur les hématies cancéreuses hémolysées. Reprenant ces travaux J. ROCHE et E. BULLINGER [60] établissent que l'enzyme des hématies laquées de cheval est presque insensible à la présence des ions Mg^{++}, alors que les fluorures et les oxalates l'inhibent très faiblement. Ces différences s'attenuent quand l'enzyme des hématies a été séparé de son milieu naturel par adsorption sur kaolin ; il devient alors plus activable par Mg^{++}.

Si dans le règne animal l'ion Mg^{++} exerce sur cette phosphatase une action activante assez faible, il n'en est pas de même dans le règne végétal où cette activation, très nettement caractérisée dans les levures [66] [30] à une concentration en Mg^{++} de M/100, est même indispensable ; pour ALBERS [3] toutefois, le magnésium serait faiblement inhibiteur. Ces différences de sensibilité vis-à-vis des ions Mg^{++} dans les hémolysats et dans les extraits de levure tirent probablement leur origine d'une

inégalité dans le degré naturel d'activation de l'enzyme ; aussi ne constituent-elles pas un critère d'individualité de la phosphatase des hématies et de celle des levures. Au reste, cette manière de voir est en plein accord avec des observations de Giri [32], établissant que la sensibilité des diverses phosphatases animales à l'activation par les sels de magnésium augmente avec le degré de purification de l'enzyme. Aussi peut-on considérer les monophosphoestérases A_4 des hématies et des levures comme un même enzyme existant dans des conditions naturelles différentes lui conférant des caractères particuliers suivant sa localisation.

Les combinaisons phosphoriques sont contenues dans les globules rouges des divers animaux en proportions très diverses [28]. Chez le mouton par exemple après une heure d'hydrolyse à 100° en milieu HCl N, le phosphore (orthophosphorique) libre représente 73 p. 100 du phosphore total des hématies alors qu'il est seulement de 20 p. 100 chez le cobaye. L'hydrolyse chlorhydrique des esters des hémolysats de globules anucléés évolue dans le temps de la même manière que celle d'extraits de muscle, avec rapide dédoublement des pyrophosphates chez les Mammifères [59 *bis*], tandis que les globules nucléés de pigeon ne libèrent que très peu d'acide phosphorique au début des opérations. Après incubation des hématies pendant deux heures à 37° C la courbe d'hydrolyse de l'hémolysat en fonction du temps est peu modifiée ; mais l'addition de Mg^{++} augmente le taux du phosphore minéral alors que celle du fluorure de sodium le diminue [57 *bis*] (A. Roche et J. Roche ; J. Roche ; von Euler et Brand).

Les combinaisons phosphorées, déjà très diverses d'un animal à l'autre le sont encore plus dans des organes bien définis. Et c'est ainsi que dans les hématies ces combinaisons différentes ne feront pas intervenir qu'une seule phosphatase. Nous y trouverons en effet, à côté de la phosphatase de pH optimum 6, la phosphatase A_1 de pH optimum 9 dont la stabilité se révèle beaucoup plus

grande [60] : adsorbable sur kaolin au pH de 6 elle passe spécifiquement en élution à pH = 9,5 alors que l'enzyme A_4 simultanément adsorbé s'inactive dans les mêmes conditions. Et comme nous le verrons plus bas il y existe en outre une phosphatase « très acide ». Dans la levure basse, aux côtés de la phosphatase « très acide », Albers [3] note la présence d'une « α-phosphatase » spécifique dont le pH optimum se situe aux environs de la neutralité. Le magnésium se montre inhibiteur à son égard à l'inverse de ce que nous avons vu jusqu'à présent. D'autre part, nous savons que dans le cas des phosphatases « neutres », Mg^{++} agit de façon très variable, ce qui serait dû à des déplacements de coferment plus ou moins lié d'apoferment à ce pH, comme à des modifications d'apoferments.

Type A_2.

Existence : Robison et Soames [65] ont émis en 1924 l'hypothèse qu'il pouvait y avoir dans certains organes des mammifères, une phosphatase, différente de la phosphatase alcaline A_1 et dont le pH optimum serait plus bas. Les recherches de Davies [26] dix ans plus tard, signalent à nouveau dans le foie et la rate, mais non dans le rein, le plasma, les hématies, l'intestin, les os, une phosphatase dont le pH optimum se situe aux environs de 4,8 entre 4,4 et 5. Les recherches de Courtois [22] ont mis en évidence une phosphatase de même pH optimum d'action dans divers organes végétaux (graines) ; notre travail se rapportant plus particulièrement aux phosphatases animales, nous ne ferons que signaler ces importants travaux. Parallèlement à ces résultats, Belfanti, Contardi et Ercoli [17] retrouvent dans le foie une action phosphatasique présentant deux pH optima différents : un en zone alcaline à pH = 9-10, un en zone acide de pH = 3 à 6. Mais ils admettent que, dans le cas de l'enzyme acide, il s'agit peut-être de la phosphatase de pH optimum = 3 mise en évidence par

Kobayashi et Inouye et dont les propriétés seraient modifiées par une substance inconnue « X ». Pourtant, dans le foie non lavé, Bamann et Riedel [12] montrent clairement que les courbes d'hydrolyse du glycérophosphate de sodium en fonction du pH présentent en plus de celui voisin de 9 un second optimum moins prononcé au voisinage de pH = 5. L'existence dans ces organes d'un enzyme nouveau du même groupe, simultanément à la phosphomonoestérase A_1 est alors à juste titre envisagée par ces auteurs. Au reste, reprenant leurs travaux, Bamann et Diederichs [8] séparent au moyen de l'inactivation sélective par l'ion H^+ ces deux enzymes, apportant ainsi la preuve formelle de l'existence de la phosphomonoestérase A_2. Ils isolent également cette phosphatase des lipases qui l'accompagnent dans le foie en faisant une extraction acétique. La labilité de l'estérase et la stabilité de la phosphomonoestérase, dans ces conditions, permettent la séparation. Bamann et Salzer [13] [14], de plus, avaient observé que les préparations de foie et de rate présentaient un optimum intermédiaire à pH = 4,7 (tampon au véronal ou acétoacétique). Il y avait exaltation de l'optimum 5,5 à 37° C. alors qu'à 18° C. l'optimum 3,7 était plus élevé que l'optimum à pH = 5,5. Ils arrivent avec précision à individualiser la phosphatase A_2. Les méthodes d'adsorption donnant un enzyme nettement actif à pH = 4 tandis que l'enzyme de pH optimum 5,5 est partiellement inactivé, ils inactivent sélectivement par les alcalis l'enzyme de pH optimum 4. Ils réfutent donc l'assertion de Waldschmidt Leitz, selon laquelle la phosphatase de pH optimum = 5,5 des organes proviendrait de la phosphatase des hématies. Leur action préférentielle différente vis-à-vis des α- et β-glycérophosphates de même que leur comportement à l'égard du magnésium sont des preuves suffisantes. Deux ans plus tard, Giri et Datta [33] la retrouvent dans le cerveau aux côtés de la phosphatase A_1. Plus récemment elle est encore signalée en faible quantité dans le sérum normal, de même dans l'urine

[43], alors que son taux d'activité croit dans certains cas pathologiques [49]. Enfin KUTSCHER [43], au moyen de l'appareil à cataphorèse de THEORIELL, montre que le point isoélectrique de la protéine de la phosphatase de la prostate, de pH optimum acide, se situe vers pH = 4,4. KUTSCHER, établit une courbe d'inactivation en fonction du pH en maintenant l'enzyme durant des temps déterminés à différents pH et en déterminant ensuite l'activité. La phosphatase prostatique est instable en milieu acide ; elle s'inactive rapidement à pH < 4. Restait à distinguer si cette inactivation résultait d'une action favorable sur la dissociation en apo- et co-ferment ou si elle était due à une inactivation non spécifique de l'apoenzyme (protéine de support). C'est ce qui a été fait en déterminant l'influence de la concentration en tampon et en mesurant l'influence de la dilution. En augmentant la concentration en tampon on obtient une inactivation forte comme par une grande variation de pH. Si la dilution augmente l'inactivation diminue. Donc c'est une réaction d'inactivation non spécifique portant sur le complément activant. Ceci est en accord avec les recherches de dialyse prolongée à des pH inactivants. Dans ce cas il y a uniquement inactivation jusqu'à un certain degré, lequel est caractérisé pour un pH déterminé ; tandis que dans le cas d'une dissociation on pourrait pousser l'inactivation plus loin. Aussi la phosphatase acide de la prostate n'est-elle pas comme la phosphatase alcaline un ferment dissociable en deux constituants.

Simultanément à ces travaux, une phosphomonoestérase présentant un pH optimum d'activité au voisinage de pH = 5 était séparée, par UZAWA [73] des extraits de son, des champignons par NGUYEN-VAN THOAI [54] en utilisant les méthodes d'adsorption, où elle hydrolyse indifféremment de nombreux esters et où elle se trouve à l'état extracellulaire. PFANDKUCH [57] dans les pommes de terre et les betteraves sucrières note qu'au pH optimum 5,8-5,9 une phosphatase se trouve, hydroly-

sant les α et β glycérophosphates, l'acide phosphoglycérique, l'hexosediphosphate. Courtois [23] la signale également dans les graines, notant que les graines oléagineuses sont plus actives que les amylacées.

Malgré la diversité des lieux où nous la rencontrons, le degré de pureté auquel on a pu l'obtenir nous permet de fixer entre 4,5 et 5,5 le pH optimum de cette phosphomonoestérase acide dans les organismes animaux.

Essais de purification : Les extraits aqueux de tissus animaux contiennent cet enzyme, parallèlement du reste à la phosphatase A_1, mais on peut le libérer en utilisant sa stabilité plus grande dans une solution acide faible [9]. Bamann et Diederichs [9] font remarquer que les préparations contiennent encore des estérases pouvant être inactivées par traitement à l'acide acétique, la phosphomonoestérase étant détruite plus lentement. Giri et Datta [33] signalent que, dans le cerveau, où nous retrouvons simultanément les phosphatases A_1 et A_2, l'ultra-filtration de l'extrait aqueux précipité par l'acétone, donne une poudre où l'activité de la phosphatase de pH optimum 5 est maintenue, alors que celle de pH optimum 9 est affaiblie. Bamann et Salzer [13] [14] [15] arrivent aussi à la séparer dans le mélange des phosphatases A_2 et A_3 : les extraits obtenus à partir d'organes desséchés à l'acétone sont traités, les uns par l'acide acétique N/40, les autres par l'ammoniaque N/40, pendant une demi-heure, puis les deux sont dialysés : les extraits acétiques présentent toujours deux optima à pH = 4 et à pH = 5,5. Les extraits ammoniacaux montrent constamment un seul optimum à pH = 5,5. Uzawa [73] obtient à partir du son de riz une préparation purifiée de l'enzyme : 50 g. de son, additionnés de 500 cm³ d'eau sont laissés deux jours à 37° C, puis dialysés. On adsorbe ensuite pendant une heure à 37° C sur 5 g. de kaolin, 100 cm³ du dialysat additionnés de 95 cm³ de CH_3 COOH M/2 + 0,5 cm³

de CH_3 COO Na M/2. On lave puis on élue par 50 cm^3 de phosphates M/10 à pH = 6,8 pendant une heure à 37° C. La préparation purifiée ainsi obtenue se conserverait des mois sous toluène ; son pH optimum d'action est de 5,5.

Action sur divers substrats : Etudiant alors son activité vis-à-vis de différents substrats Uzawa constate qu'elle hydrolyse l'acide glycérophosphorique β, les acides glycolphosphorique, phénylmonophosphorique, nitrophénylphosphorique, cyclohexylphosphorique et méthylcyclohexylphosphorique, toutefois de façon générale, plus difficilement les diesters que les monoesters, le pH optimum d'action ne variant pas. Dans les champignons [54] elle hydrolyse indifféremment de nombreux esters. D'après Courtois, la phosphatase A_2 des graines de moutarde hydrolysant le β- plus rapidement que l'α-glycérophosphate serait une glycérophosphatase mixte présentant des affinités égales vis-à-vis des deux isomères mais possédant des groupes actifs dédoublant plus rapidement la forme β. Vis-à-vis des deux isomères, les affinités croissent de façon égale avec l'acidité du milieu tandis que les variations de vitesses maxima en fonction du pH sont différentes. Dans les amandes, il note que l'enzyme brut dédouble avec une vitesse égale les deux isomères α et β du glycérophosphate. Dans les organes, Davies [26] pour le foie et la rate, Giri [31] pour le cerveau, notent également que c'est l'isomère β du glycérophosphate de sodium qui est hydrolysé plus vite que l'α.

Activateurs et inhibiteurs : Belfanti, Contardi et Ercoli [17] montrent clairement que le fluorure et l'oxalate de sodium inhibent l'activité de la phosphatase acide du foie de Lapin. Ce caractère inhibiteur du fluorure se manifeste de manière à peu près constante, que cette phosphatase provienne du cerveau [18] du sérum [49] ou de la prostate [44] ; dans ce dernier cas Kutscher [45] constate qu'avec l'enzyme purifié l'inhibition, très

forte vis-à-vis du glycérophosphate de sodium, est faible vis-à-vis du phénylphosphate. Or la présence du sodium ou du potassium ne modifie pas l'action inhibitrice du fluorure. Cette action croît avec la concentration en fluorure, or, il ne s'agit pas d'une inactivation irréversible (provenant d'une modification de l'enzyme) car l'inhibition est indépendante de la durée de l'hydrolyse. La réaction est instantanée et l'on ne semble pas avoir affaire à une réaction comparable à celle des sels minéraux sur les protéines. L'inhibition croît quand la concentration en substrat décroît : si elle est de 30 p. 100 lorsque la concentration en substrat correspond à 24 mg. P organique elle passe à 55 p. 100 lorsque cette dernière est de 6 mg. P organique ; si la concentration en fluorure augmente, celle au substrat diminuant, l'inhibition augmente encore. Et l'auteur conclut de là que le substrat et F^- se fixent au même groupement de l'enzyme, vis-à-vis duquel le phénylphosphate semble avoir une plus grande affinité que le fluorure. Cette inhibition du fluorure de sodium est constatée également pour la phosphatase extraite du riz mais Munemura [53] remarque que l'oxalate n'aurait pas d'action notable. Pour Courtois [22] l'inhibition par les fluorures serait proportionnelle à la concentration du subtrat. Inhibé également par les arséniates l'enzyme serait insensible ou légèrement inactivé par de faibles doses de sels de magnésium alors qu'il est peu activé par la strychnine, ces caractères étant communs pour l'enzyme extrait de la moutarde blanche et de l'amande. D'après Giri [31], l'ion Mg^{++} serait sans action, le fluorure et l'oxalate de sodium étant inhibiteurs de même que le cuivre. Le cyanure est sans action, l'acide ascorbique seul est un inhibiteur assez faible alors que si on lui adjoint du cuivre on obtient une inhibition très énergique qui serait due à la formation d'acide dehydroascorbique.

Dans la phosphatase qu'il extrait de la pomme de terre et des betteraves sucrières, Pfandkuch retrouve avec le fluorure de sodium une perte d'activité qui est d'un tiers

pour une concentration M/2000 en fluorures, cette inhibition par les fluorures baissant en même temps que la concentration en substrat ; il signale l'action inhibitrice des ions $PO_4^{\equiv}$, Mg^{++} étant sans action. Quant au cuivre il est fortement inhibiteur, sauf en présence de glutathion (G-SH) et de cyanogène. Le glutathion seul est sans action, de même que l'acide ascorbique ; ce dernier toutefois lève l'inhibition provoquée par le cuivre. Knoevenagel [39] retrouve cette indifférence du magnésium mais vis-à-vis de l'α-glycérophosphate seulement ; il activerait en effet le β-, cette activation augmentant avec la concentration en Mg^{++} sans quil y ait de concentration optimum. Il constate aussi l'inhibition par le fluorure, cette inhibition s'atténuant avec le vieillissement des préparations.

Davies [26] constate dans les organes animaux que l'ion Mg^{++} inhibe légèrement la phosphatase A_2. Ce caractère inhibiteur du magnésium est du reste retrouvé de façon constante par Nguyen-van Thoai [64] dans les champignons où il constate, de plus, que l'ion Mg^{++} exerce dans tous les cas une action protectrice vis-à-vis de l'effet inhibiteur produit par les ions PO_4^{---}. Il en est de même de l'inhibition de ces enzymes par les arséniates [61]. Les sels de magnésium diminuent en outre dans le cas de cet enzyme dont ils sont inhibiteurs, l'affinité de la phosphatase vis-à-vis du β-glycérophosphate de sodium. Considérés au contraire comme activateurs par Munemura, les sels de magnésium seraient sans action sur la phosphatase A_2 des organes d'après les travaux de Bamann et ses collaborateurs sur le foie et la rate, d'après ceux de Giri et Datta sur le cerveau.

Généralités : Si dans le règne animal nous trouvons une certaine unité dans les résultats (légère inhibition ou action nulle vis-à-vis de l'ion Mg^{++}, action préférentielle vis-à-vis du β-glycérophosphate reconnue de façon constante, pH optimum entre 4,5 et 5) il n'en est pas de même dans le règne végétal. Or ces contradictions

portent sur les points même qui ont servi de base pour la classification de Folley et Kay ? Nous ne saurions dès lors reconnaître à cette classification qu'un caractère commode, mais certainement provisoire. Nous avons vu que, d'après les théories modernes sur la constitution des phosphatases, les holoenzymes sont dédoublables et que des ions métalliques dialysables interviennent dans le coferment. Aussi, étant donnée l'hétérogénéité des milieux où l'on a étudié les caractères des phosphatases, la variété des traitements préalables auxquels on les a soumises sans les obtenir suffisamment pures, voit-on qu'il serait vain de se maintenir dans le cadre d'une classification visiblement trop stricte.

Type A_3.

Existence : C'est dans le règne végétal que cette phosphatase « très acide » a d'abord été découverte et par la suite étudiée. Aussi, bien que les phosphatases animales soient seules envisagées dans ce travail, il convient dans cette revue d'ensemble de signaler quels furent les premiers travaux entrepris. C'est en 1927 que Kobayashi [40] isole de l'*Aspergillus orizae* la phosphatase de la takadiastase : ferment acide qui, réagissant à l'état non purifié, présente un pH optimum entre 5,5 et 5,6. Mais après purification son pH se trouve déplacé : si on l'adsorbe sur kaolin à pH = 4,1 pour l'éluer ensuite à pH = 5,6 elle ne présente plus qu'un optimum à pH = 3. Pour ces auteurs une susbtance « x » accompagnerait l'enzyme non purifié et ils ont pu l'adsorber sur alumine à pH = 7. Ajoutée à la takadiastase purifiée de pH = 3 à 4 elle lui ferait retrouver le pH optimum de 5,6. Ces travaux se trouvent confirmés l'année suivante par Inouye et dans la classification de Folley et Kay cette phosphatase « très acide » de pH optimum voisin de 3, hydrolysant les phosphomonoestérases constitue le type A_3.

Dans les levures basses et hautes, Albers [3] signale

à nouveau sa présence, notant qu'elle est plus abondante dans les secondes que les premières, ce que confirment Schäffner et Krumey [67]. Enfin Courtois [22] a repris dans une étude systématique chez différents végétaux supérieurs l'étude de cette phosphatase au pH optimum = 4 de la takadiastase. Chez les basidiomycètes aussi [54] l'utilisation de diverses méthodes d'extraction faisant varier l'intensité de l'autolyse permet de conclure que la monoestérase de pH optimum 3,4-3,6 qui s'y trouve est en présence d'inhibiteurs naturels et que seules les méthodes de purification permettent de la mettre en évidence. La présence d'inhibiteurs naturels s'observe de même pour l'enzyme de la levure haute d'Albers.

Très bien défini dans le règne végétal cet enzyme est beaucoup moins étudié dans le règne animal. C'est Asakawa [6] qui le signale pour la première fois dans le rein de porc avec un pH optimum de 3. L'année suivante Hori [35] note que les hémolysats de globules présentent un trouble à partir de pH = 5 ; trouble qui augmente avec l'acidité. Toutefois, alors que la phosphatase des hématies isolées a un pH optimum à 5, en présence de sérum celui-ci passe à 4, ce qui est interprété comme une action stabilisatrice du sérum contre la destruction de la phosphatase. De plus, avec le venin de *Trimeresurus flavoviridis,* Hori obtient un hémolysat, sans trouble à pH = 3, où l'activité phosphatasique optimum vis-à-vis des monoestérases se situe entre pH = 3,2 et pH = 2,9. A ce pH il hydrolyse préférentiellement le β-glycérophosphate de sodium vis-à-vis du dérivé α.

Caractères : En 1937 les travaux de Bamann et Salzer [15] vont nous permettre de l'identifier de façon précise ; dans le foie et la rate, à côté de la phosphatase A_2 de pH optimum de 5,5, ils notent un second optimum plus acide près de pH = 4. On aurait pu penser qu'il s'agissait comme dans le cas de la takadias-

tase de l'action d'une substance « inconnue » accompagnant l'enzyme. Ces auteurs montrent qu'il n'en est rien. En effet, les purifications ne déplacent pas le pH optimum 5,5 vers l'acidité ; bien au contraire elles ont pour unique résultat d'accentuer le pH optimum de 4, du moins lorsque celui-ci se montre dans les préparations enzymatiques. Enfin le traitement des préparations à pH = 8,3 une demi-heure par l'ammoniaque à 1 pour cent permet de garder dans celles-ci un seul optimum à pH = 5,5, l'enzyme correspondant à l'autre optimum étant inactivé. Ces faits suffisent à établir de façon indiscutable la présence dans certains organes animaux d'une phosphatase « très acide » de pH optimum compris entre pH = 3 et pH = 4.

La phosphatase des levures hautes qu'Albers obtient facilement à l'état desséché, par chauffage à 30° C, et dont le pH optimum est à 4, est pour Schäffner et Krumey [67] un enzyme extracellulaire non spécifique, inhibable par l'ion Mg^{++} ; non influençable par les dérivés sulfhydrylés, l'acide ascorbique, l'acide iodacétique il hydrolyse l'α-glycérophosphate de sodium à la même vitesse que le dérivé β et que l'hexosediphosphate. Bamann et Salzer [15] reprenant l'étude de la phosphatase acide de la takadiastase notent qu'elle est activée par les citrates et ils expliquent cette action par un déplacement de l'optimum dû à l'élimination d'un inhibiteur naturel et à la restitution d'un antiinhibiteur dialysable. Elle hydrolyse le β-glycérophosphate de sodium préférentiellement au dérivé α, l'ion Mg^{++} n'exerçant aucune action. Pour eux les nombreuses variations observées avec la takadiastase doivent être rapportées aux variations de concentration des inhibiteurs et antiinhibiteurs. Courtois [22] étudiant également la takadiastase précise qu'elle est très faiblement activée par l'ion Mg^{++}, insensible à l'action de faibles doses de glycérol, les arséniates, les phosphates, les fluorures et le nitrate de strychnine étant également inhibiteurs de cette diastase.

La phosphatase des Basidiomycètes par contre [54], lyoenzyme agissant à pH = 3,2 est très sensible à l'action inhibitrice de l'ion Mg^{++}. Elle agit spécifiquement sur les glycérophosphates, n'hydrolysant aucun des autres esters phosphoriques.

Ici encore nous retrouvons de multiples controverses au sujet de l'action du magnésium. Mais, d'une façon générale, nous pourrons conclure, en opposition avec son action toujours activatrice vis-à-vis des phosphatases de pH optimum voisin de 9, à son effet inhibiteur ou indifférent vis-à-vis des phosphatases à pH optima voisins de la neutralité et acides. Dans tous les cas pourtant les sels de magnésium exercent une action protectrice vis-à-vis de l'inhibition par les ions PO_4^{---}. Il est probable que les modifications par le magnésium des affinités des phosphatases sont dues à un effet direct sur l'apoenzyme tandis que l'action antagoniste de l'ion PO_4^{---} peut être rattachée soit à la formation de phosphate de magnésium, soit à une action secondaire sur un groupement spécifique auquel se combine les ions phosphoriques.

IV. — Pyrophosphatases acides (animaux et végétaux).

A. — Pyrophosphatase « neutre ».

Nous avons vu que, dans le cas des pyrophosphatases, d'après la classification de Folley et Kay [30], aucun enzyme spécifique n'est signalé dans la marge de pH comprise de 5,8 à 6,4. Cependant en 1931 J. Roche [58] a remarqué que l'action d'une pyrophosphatase à pH = 6 environ, peu marquée dans les préparations d'hématies ou de sérum, où Kay avait déjà signalé son existence, est, par contre, importante dans celles de globules blancs et de divers tissus. De telles différences suggérèrent que la pyrophosphatase était un enzyme distinct, dont il y avait lieu d'établir la spécificité dans

des recherches ultérieures. C'est ce qu'ont réalisé de nombreux auteurs (Bamann, Kay, Kurata, Munemura, Satoh).

Dans la levure basse, Schäffner et Bauer [66] [16] séparent une phosphatase active sur le pyrophosphate au pH optimum de 6, dont l'action est favorisée par l'ion Mg^{++} à la concentration optimum M/1000. Nguyen-van Thoai [55] établit l'existence chez les basidiomycètes de la pyrophosphatase de pH optimum 6, active seulement après élimination de l'inhibiteur naturel qui l'accompagne dans les préparations.

B. — Pyrophosphatase « acide ».

Kurata a pu distinguer une pyrophosphatase de pH optimum 4 et une de pH optimum 8-9 ; Takahashi une de pH optimum compris entre 5 et 6. Or Bamann et Gall [10] ont retrouvé une pyrophosphatase de pH optimum 3,9 à 4,2, une seconde de pH = 5,5 à 6 et une troisième de pH optimum 7,6 à 8,3. Ils opèrent sur une préparation enzymatique obtenue à partir de la pulpe de foie traitée par l'acétone, puis mise à macérer une demi-heure avec vingt fois son volume d'eau, d'acide acétique N/40 ou d'ammoniaque N/40, et enfin dialysée vingt-quatre heures. La préparation ammoniacale sans magnésium présente un optimum à pH = 5,5 alors qu'avec des ions Mg^{++} on obtient deux optima respectivement aux pH = 5,5 et 7,6-8,3. La préparation acétique donne un optimum peu net entre pH = 4 et pH = 5, parfois un optimum net à pH = 4,0-4,2.

L'optimum au pH = 5,5 ne saurait être considéré comme résultant des activités aux pH plus acides ou plus alcalins, puisque en l'absence de l'ion Mg^{++} la pyrophosphatase alcaline ne se montre guère active. Du reste, l'isolement de cette pyrophosphatase « acide » est possible : l'extrait ammoniacal de pulpe de foie est amené à pH = 4,5 avec de l'acide acétique N/40 puis porté une heure à 37° C ; on obtient ainsi presque uni-

quement la pyrophosphatase de pH optimum 5,5. Quand l'extrait ammoniacal est maintenu vers pH = 9 pendant vingt-quatre heures à 37° C, toutes les phosphatases sont détruites. En ramenant le pH vers l'acidité on détruit la pyrophosphatase alcaline et il reste une préparation active de pyrophosphatase « acide » et pauvre en pyrophosphatase « très acide », de pH optimum 4. L'enzyme ainsi purifié se révèle insensible à l'ion Mg^{++} et inhibé par le fluorure, l'arséniate, l'oxalate et les phosphates [53].

C. — Pyrophosphatase « très acide ».

Avant les travaux de Bamann, Kurata [42] était parvenu, à mettre en évidence la pyrophosphatase « très acide » de pH optimum entre 3 et 4, et même à l'isoler de l'autolysat de rein ; il traitait cet autolysat par une solution rendue légèrement alcaline par de l'hydrate de magnésium, ce qui lui donnait un liquide résiduel hydrolysant l'acide pyrophosphorique à pH = 3,5 mais inactif vis-à-vis du phénylpyrophosphate et du diphénylpyrophosphate. Ces résultats concordent avec ceux établis l'année suivante par Takahashi [71] et Munemura [53] dans les mêmes organes. Nous avons vu comment dans les préparations acétiques de foie, Bamann [10] avait retrouvé cette phosphatase de façon irrégulière ; alors qu'une suspension de foie, obtenue après traitement préalable de l'organe par trois à quatre fois son volume d'eau, puis par l'ammoniaque N/40, donne avec le pyrophosphate de sodium un seul optimum à pH = 4 ; la fraction soluble ayant son pH optimum à 5. Ceci permet de conclure que cette pyrophosphatase « très acide » du foie est un desmoenzyme, qui se révèle du reste peu activable.

Après avoir fait jusqu'à présent un travail d'analyse cherchant à isoler dans chaque organe une phosphatase unique et bien caractérisée, il convient pour

avoir une notion plus juste de la réalité d'opérer maintenant en sens inverse. En effet, dans chaque organe il n'y a pas une seule phosphatase, mais un système phosphatasique et le résultat final que nous observons a le plus souvent nécessité le concours de plusieurs enzymes. De plus, à côté du système phosphatasique, déjà très complexe, nous trouvons un très grand nombre d'autres enzymes dont l'activité se développe simultanément et dont les réactions peuvent interferer avec celles réalisées par les phosphatases. Toutefois, bien que l'on puisse signaler presque partout chacune d'entre elles, nous les retrouverons mais à des concentrations variables suivant les fonctions de chaque organe en particulier. C'est pourquoi quand il s'est agi de les étudier, on a été amené à choisir dans la mesure du possible son matériel de travail.

V. — Objet du travail.

L'exposé que nous venons de faire a fait ressortir des lacunes, des contradictions et des imprécisions dans nos connaissances sur les phosphatases acides. Nous nous sommes proposée d'entreprendre des recherches sur ces enzymes, en nous attachant particulièrement à étudier les phosphomonoestérases et les pyrophosphatases acides des hématies et plus accessoirement celles du foie.

L'orientation générale de nos recherches a été la suivante :

1. La phosphoestérase A_4 des hématies n'avait pas été étudiée du point de vue de son activation ou de son inhibition par divers corps actifs sur d'autres enzymes isodynames, en particulier les thiols, l'acide ascorbique, les ions manganèse. Nous avons observé les effets de ces produits sur son activité.

2. Les travaux d'Hori laissaient prévoir l'existence dans les hématies d'une phosphatase du type A_3 ; or celle-ci n'a jamais été étudiée ; nous nous sommes pro-

posée d'établir sa présence ou son absence, et, dans la première éventualité, de décrire ses caractères.

3. La phosphomonoestérase A_4 n'étant présente que dans un petit nombre de cellules (hématies, levures) certains auteurs se sont demandés si elle ne devait pas être identifiée à l'enzyme A_2, très répandu dans la nature, des produits naturels accompagnant les enzymes pouvant en effet modifier leurs caractères. Aussi avons nous cru devoir entreprendre l'étude comparée de l'enzyme A_2 du foie et de l'enzyme A_4 des hématies.

4. Les pyrophosphatases acides, très étudiées chez les végétaux ne l'ont pas été systématiquement dans les organes animaux et il n'existe sur leur présence et leurs caractères dans les hématies aucune donnée. Des travaux préliminaires nous ayant montré que celles-ci en renferment, nous les avons étudiées et comparées à celles du foie.

DEUXIÈME PARTIE.

Recherches personnelles.

CHAPITRE I.

SUR LE SYSTÈME PHOSPHATASIQUE ACIDE DES HÉMATIES.

Introduction.

Nous avons vu que la phosphatase A_4 des hématies se retrouve dans le règne végétal chez les levures. Son pH optimum d'action se situe chez ces dernières à pH = 6 [66] et entre pH = 5,8 à 6,4 dans les hémolysats [60]. Dans les levures, l'α- glycérophosphate de sodium est hydrolysé, selon SCHÄFFNER et BAUER, préférentiellement au dérivé β, de même que les acides phosphoglycérique, hexosemonophosphorique et monophénylphosphorique ; dans les hémolysats le comportement de l'enzyme vis-à-vis de ces divers substrats est identique selon ROCHE [58]. L'ion Mg^{++} favorise très nettement l'activité phosphatasique de l'enzyme des levures [66], mais son action n'est manifeste que sur l'enzyme des hémolysats purifié. Sachant que la concentration ionique des divers milieux joue un grand rôle, au même titre que les inhibiteurs naturels, cet enzyme ayant été étudié dans des milieux hétérogènes et variés, nous ne baserons pas sur ce point une distinction spécifique. Comme inhibiteurs nous devons signaler : les oxalates et fluorures qui sont légèrement inhibiteurs dans les hémolysats [60] ; les thiols [66] inhibiteurs chez les levures où l'acide iodacétique exerce une action protectrice à leur égard.

Ce sont là, résumées, les seules données obtenues en poursuivant l'étude de cette phosphatase. Etude in-

complète et que nous allons essayer de reprendre pour les hématies en élargissant la marge des pH étudiés. En effet, vers les pH plus acides nous ne possédons aucun travail en dehors des indications fournies par Hori, sur l'existence probable, mais non caractérisée, d'une phosphatase de pH optimum situé entre 3 et 4 dans les hémolysats obtenus avec du venin de *Trimeresurus flavoviridis*.

Ce chapitre pourra donc se subdiviser ainsi.

I. — Description générale du système phosphatasique acide des hématies.

Etude dans une marge de pH comprise entre 3 et 6,5, des pH optima présentés par les pyrophosphatases et les phosphomonoestérases et de la stabilité du système.

II. — Caractères des constituants de ce système.

Action spécifique et étude des activateurs et inhibiteurs.

a) Sur les phosphomonoesters : α et β-glycérophosphate de sodium.

b) Sur le pyrophosphate de sodium (*).

I. — Description générale du système phosphatasique acide des hématies.

A. — ***Activité du système phosphomonoesterasique acide en fonction du pH.*** — Nous avons pour étudier ce système, établi en premier lieu les courbes d'activité d'hématies laquées, fraîches ou vieilles sur le β-glycérophosphate de sodium à divers pH.

Pour cela, on a placé dans des tubes jaugés à 10 cm³ :

(*) Les α- et β-glycérophosphates de sodium purs ont été préparés par M. O. Bailly ; nous le remercions de les avoir mis à notre disposition. Des échantillons de pyrophosphate de sodium pur des Maisons Prolabo et Kahlbaum ont été employés également pour nos expériences.

2 cm³ de glycérophosphate de sodium M/10 (α ou β), 2 cm³ d'une solution tampon d'un pH donné (acéto-acétique ou véronal), 1 cm³ d'hémolysat (un tiers d'hématies, deux tiers d'eau distillée) et l'on complète à 10 cm³ avec de l'eau distillée. Ces tubes sont ensuite portés six heures à l'étuve à 37° C et l'on déprotéinise à la sortie de l'étuve par 5 cm³ d'acide trichloracétique à 10 p. 100. Après filtration, on dose les phosphates sur une prise convenable par la micro-méthode de Briggs-Robison, la coloration bleue ainsi obtenue étant dosée à l'aide d'un colorimètre à cellule photoélectrique (Helcomètre) les courbes d'étalonnage établies à l'aide des solutions titrées étant fréquemment vérifiées.

Le tableau I et la figure 1 rendent compte des résultats de cette première série d'expériences :

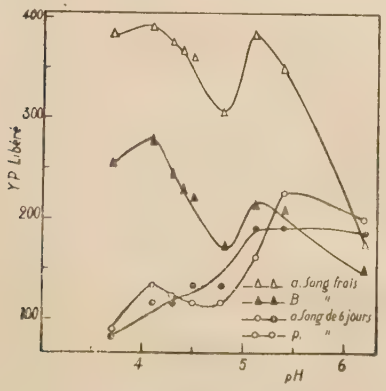


Figure 1. — *Action d'hémolysats de Bœuf frais ou conservés six jours à + 2° sur l'α- et le β-glycérophosphate de sodium à divers pH.*
Abscisses : pH.
Ordonnées : γ P libéré.

On y note l'existence, dans la plupart des hémolysats, de deux optima d'action phosphatasique très voisins, respectivement aux pH = 4,8 et pH = 5,4. Cependant certains de ceux-ci particulièrement actifs ou inactivés portant les numéros X et XIII sur le tableau I, présentent un optimum vers pH = 4,1. On pourrait alors penser que cette valeur, jamais observée jusqu'ici pour une phosphatase, reflète la destruction progressive d'un enzyme à pH optimum d'action plus acide (type A_3). L'optimum à pH = 4,8 résulterait de l'action simultanée de deux enzymes dont le

TABLEAU I. — *Activité β-glycérophosphatasique des hématies laquées à divers pH (γ P libérés)* (*).

pH	Hématies de Rat n°		Hématies de Bœuf n°											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
3,8	174	105	49	63	35	42	74	35	54	48	36	55	254	42
4,1	174	105	147	160	90	56	180	69	96	**69**	63	84	**279**	69
4,3	225	105	189	—	118	96	210	90	126	54	75	—	235	75
4,5	258	126	—	237	153	126	252	96	153	54	96	181	223	75
4,8	**342**	**159**	**237**	**286**	**174**	**147**	**267**	**105**	**168**	**69**	**120**	**230**	174	**84**
5,1	273	126	202	244	132	105	180	90	132	48	69	217	**216**	63
5,2	348	138	—	—	132	120	204	**105**	132	—	—	—	—	—
5,4	357	**147**	**202**	**244**	**139**	**147**	**204**	84	**132**	54	**75**	**229**	210	**63**
5,8	**369**	120	195	237	90	98	154	84	90	**63**	54	202	—	54
6,2	195	84	118	147	48	21	126	48	—	48	54	174	153	35

(*) Dans ce tableau comme dans les suivants, les pH optima sont objectivés par l'impression en gras des quantités de P libérées.

plus acide, manifestant son activité de manière irrégulière en raison de sa labilité, aurait son pH optimum d'action aux environs de pH = 4,1 ; l'autre étant à pH = 5,8.

B. — ***Activité du système pyrophosphatasique acide en fonction du pH.*** — Parallèlement à ce qui a été fait pour le système phosphomonoestérasique nous avons en premier lieu établi les courbes d'activité d'hématies laquées, fraîches ou vieilles, sur le pyrophosphate de sodium à divers pH. Le processus expérimental est identique si l'on remplace toutefois 2 cm³ de glycérophosphate de sodium par la même quantité de pyrophosphate de sodium M/10.

TABLEAU II. — *Activité pyrophosphatasique des hématies laquées à divers pH (γ P libérés).*

pH	Hématies de Bœuf N°						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
3,8	**96**	36	**120**	63	**105**	69	90
4	63	**120**	111	69	96	**105**	**111**
4,2	63	105	105	**111**	63	35	111
4,4	42	90	111	96	75	63	81
4,8	69	75	**147**	96	63	**154**	90
5	**90**	69	138	**105**	84	54	**120**
5,4	84	63	126	96	**154**	**96**	105
5,8	74	**90**	**138**	96	48	84	**120**
6	48	75	132	84	42	84	120

Les résultats du tableau II et de la figure 2 traduisent l'existence dans les hémolysats de sang de Bœuf de deux pyrophosphatases ; l'une active dans la marge de pH très acide, entre pH = 3,8 et pH 4,1, semble plus résistante que la phosphomonoestérase correspondante puisque nous la trouvons de façon constante dans chacune de nos expériences ; la seconde aurait son pH optimum entre pH = 5,4 et pH = 5,8. Mais, là encore, l'action simultanée de deux enzymes d'optima assez proches fait surgir un troisième

optimum *fictif*, entre pH = 4,8 et pH = 5, qui résulte, comme dans le cas précédent, de l'action conjuguée des deux enzymes. Du reste, la stabilité relative de ces enzymes, en fonction du temps de conservation des hémolysats d'une part, en fonction de la température et du temps d'hydrolyse d'autre part, va nous permettre de séparer les deux optima ou de les faire apparaître séparément.

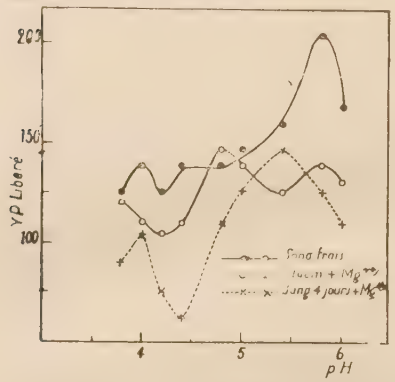


FIGURE 2. — *Activité pyrophosphatasique des hématies laquées fraîches ou conservées 4 jours à + 2° (Bœuf) à divers pH en présence ou en l'absence de SO_4 Mg 0,005 M.*

Abscisses : pH.
Ordonnées : γ P libéré.

C. — ***Action du temps sur l'activité phosphatasique des hémolysats.*** — En raison de la nature protéique et de l'état colloïdal des enzymes leur conservation dans le milieu naturel où on

TABLEAU III. — *Action d'hémolysats de sang de Bœuf, frais ou conservés à + 2° sur le β-glycérophosphate de sodium, à divers pH (γ P. libérés).*

pH	I		II	
	1er jour	6e jour	1er jour	2e jour
3,7	254	84	74	63
4,1	**279**	**118**	180	75
4,3	235	118	210	120
4,4	229	—	—	—
4,5	223	138	252	153
4,8	174	138	**267**	**174**
5,0	**216**	**195**	180	126
5,4	210	195	204	171
6,2	153	189	126	48
6,5	105	135	—	—

TABLEAU IV. — *Action du temps et de la température sur le dédoublement du β-glycérophosphate de sodium et du pyrophosphate de sodium par les hématies laquées (Bœuf) (γ P. libérés).*

pH	Glycérophosphate de sodium								pH	Pyrophosphate de sodium	
	37°		37°		6 heures					6 heures	
	6 h.	20 h.	6 h.	20 h	37°	25°	25°	25°		37°	25°
3,8	36	36	28	30	36	48	48	48	3,8	**120**	**105**
4,1	**63**	**54**	**69**	**57**	63	**63**	**69**	**69**	4	**111**	96
4,3	75	96	76	69	75	54	54	54	4,2	105	63
4,5	96	132	69	69	96	54	54	54	4,4	**111**	75
4,8	**120**	**168**	**146**	**96**	**120**	**63**	54	**69**	4,8	**147**	63
5	69	126	84	96	69	42	42	48	5	**138**	84
5,4	**75**	**138**	**146**	**126**	**75**	42	42	54	5,4	126	**154**
5,8	54	96	—	—	54	42	42	**63**	5,8	**138**	48
6,2	54	48	63	96	54	42	36	48	6	132	42

les trouve peut, par suite de réactions secondaires et de phénomènes d'autolyse, influer sur leurs propriétés. Nous pourrons voir se produire naturellement des activations ou des inhibitions sélectives.

Les résultats exprimés dans ce tableau et les courbes de la figure 1 obtenues avec les hématies laquées, fraîches ou conservées six jours à la glacière à + 2° C. illustrent la labilité des deux enzymes ; celui à pH optimum d'action le plus acide disparaît en six jours, comme c'est également le cas pour la phosphatase A_3 des levures et des basidiomycètes.

D. — ***Action de la température et de la durée d'hydrolyse sur le dédoublement du β-glycérophosphate de sodium par les hématies laquées*** (Bœuf). — On trouvera dans le tableau IV les résultats obtenus à cet égard.

En prolongeant la durée d'hydrolyse nous voyons un déplacement de l'optimum vers l'alcalinité ; l'enzyme « très acide » étant détruit alors que l'autre enzyme de pH optimum 5,4-5,8 résiste mieux. Au contraire si nous réalisons l'hydrolyse à 25° C au lieu de 37° C l'optimum « très acide » se révèle nettement aux dépens même de l'autre dont l'activité à cette température doit être très faible. Nous constatons le même fait vis-à-vis des pyrophosphates.

E. — ***Conclusion.*** — Ces faits confirment l'*existence de deux phosphomonoestérases acides isodynames* dont le pH optimum ne peut pas être fixé avec une très grande précision dans les hémolysats. Pour l'une, le pH optimum d'action paraît voisin de pH = 5,4 à pH = 5,8 ; elle résiste bien à l'autolyse quand les hémolysats n'ont pas plus de six à dix jours ; sa température optimum d'hydrolyse est à 37° C. L'enzyme « très acide » A_3 a son pH optimum proche de pH = 4,1 ; celui-ci pourrait être inférieur lorsque le laquage est obtenu par certains venins de serpents (Hori, Hashimoto). Il se détruit très rapidement dans les hémolysats, ainsi que lorsqu'on le porte quelques heures à une température de 37° C.

Par ailleurs, nous voyons apparaître également *deux pyrophosphatases*, celle très acide, de pH optimum d'action entre pH = 3,8 et pH = 4,1, beaucoup plus résistante que l'enzyme correspondant de la série des phosphomonoestérases ; elle hydrolyse le pyrophosphate à 25° C comme à 37° C ; la seconde de pH optimum d'action à pH = 5,4-5,8 demande pour ses hydrolyses une température d'au moins 37° C.

Etudiant d'abord les monoestérases nous allons voir que ces deux enzymes diffèrent en outre par tout un ensemble de propriétés.

II. — Caractères des constituants du système phosphatasique des hématies.

A. — Phosphomonoestérases.

Nous étudierons, en premier lieu, la spécificité de ces phosphatases vis-à-vis des deux isomères du glycérophosphate de sodium ainsi que l'influence de l'ion Mg^{++} sur leur activité. Ceci en vue d'établir la comparaison avec les enzymes du même groupe, la classification actuelle reposant, nous l'avons déjà vu sur ces deux caractères, en dehors du pH optimum d'action. Les travaux modernes ayant prouvé le rôle primordial des métaux, du manganèse en particulier, pour l'activité des phosphatases, nous étudierons le rôle de l'ion Mn^{++} sur la marche de la réaction d'hydrolyse. Enfin connaissant la présence dans les hématies d'un système oxydo-réducteur très puissant nous avons cru bon de faire des essais avec les corps pouvant participer à ce système : acide ascorbique, cystine, cystéine, glutathion (G-SH). Et comme, *a priori*, on aurait pu rattacher une action de ces corps à leur pouvoir réducteur, nous avons poursuivi nos essais sur l'effet du sulfite de sodium et du sulfate ferreux. Toutes ces expériences ont été faites dans des conditions identiques : concentration en produit 0,0015 M, hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium pendant 6 heures à 37° C.

1. — ***Action sur les*** α- ***et*** β- ***glycérophosphates de sodium.*** — Les courbes reproduites sur la figure 1, avec le même hémolysat établissent que *ces deux phosphatases se comportent de la même manière* vis-à-vis des deux isomères du glycérophosphate de sodium : *l'isomère* α *est hydrolysé plus rapidement que l'isomère* β ; cela même dans les préparations vieillies où l'activité enzymatique se trouve très affaiblie. En dehors de ce caractère commun nous allons voir que ces deux enzymes se comportent le plus souvent différemment.

2. — ***Action de l'ion*** Mg^{++}. — Cette action a d'abord été étudiée pour diverses concentrations en sulfate de magnésium aux deux optima et le tableau suivant rend compte des résultats obtenus.

TABLEAU V. — *Action du sulfate de magnésium à diverses concentrations sur l'activité* β*-glycérophosphatasique et* α *glycérophosphatasique des hématies laquées (Bœuf) à pH = 4,1 et pH = 5,4.*

	Mol. SO_4 Mg par litre	pH = 4,1		pH = 5,4	
		γ P libérés	p. 100 d'inhibition	γ P libérés	p. 100 d'activation
α-Glycérophosphate de sodium	0	250	témoin	273	témoin
	0,005	147	— 41	348	+ 26
	0,010	105	— 58	355	+ 30
	0,100	15	— 94	282	+ 3
β-Glycérophosphate de sodium	0	139	témoin	147	témoin
	0,005	105	— 24	210	+ 42
	0,010	76	— 45	232	+ 50
	0,100	34	— 75	202	+ 37

Aux deux optima l'ion Mg^{++} se comporte inversement pour une concentration optimum de 0,010 molécule de SO_4Mg par litre.

Ces premiers résultats ont été confirmés par d'autres séries d'expériences où l'on réalise l'hydrolyse des α- et β- glycérophosphates sur une échelle de pH allant de pH = 3,8 à pH = 6,2 ; cela en l'absence et en présence de sulfate de magnésium à la concentration de 0,010 M par litre.

TABLEAU VI. — *Action de Mg^{++} sur l'activité β-glycérophosphatasique des hématies laquées (Bœuf) en fonction du pH. ($[SO_4\ Mg] = 0{,}010\ M$).*

pH	γ P libérés											
	sans Mg^{++}	avec Mg^{++}	p. 100 d'activation (+) ou inhibition (—)	sans Mg^{++}	avec Mg^{++}	p. 100 d'activation (+) ou inhibition (—)	sans Mg^{++}	avec Mg^{++}	p. 100 d'activation (+) ou inhibition (—)	sans Mg^{++}	avec Mg^{++}	p. 100 d'activation (+) ou inhibition (—)
3,8	55	34	— 38	34	34	—	35	15	— 57	54	36	— 33
4,1	84	32	— 62	76	48	— 36	69	36	— 47	75	48	— 50
4,3	—	—	—	—	—	—	90	74	— 17	71	111	— 8
4,4	181	226	+ 25	132	210	+ 59	96	111	+ 15	67	174	+ 13
4,8	250	259	+ 3	195	250	+ 28	105	132	+ 25	65	237	+ 41
5	217	244	+ 12	195	229	+ 17	105	132	+ 25	70	195	+ 48
5,4	229	273	+ 14	216	278	+ 28	84	159	+ 89	70	243	+ 69
5,8	202	259	+ 28	226	250	+ 10	48	147	+206	76	225	+150
6,2	174	265	+ 52	189	226	+ 19	—	—	—	—	—	—

TABLEAU VII. — *Action de Mg^{++} sur l'activité α glycérophosphatasique des hématies laquées (Bœuf) en fonction du pH ($[SO_4\ Mg] = 0{,}0010\ M$).*

pH	γ P libérés								
	sans Mg^{++}	avec Mg^{++}	p. 100 d'activation (+) ou d'inhibition (−)	sans Mg^{++}	avec Mg^{++}	p. 100 d'activation (+) ou d'inhibition (−)	sans Mg^{++}	avec Mg^{++}	p. 100 d'activation (+) ou d'inhibition (−)
3,8	34	34	—	63	63	—	49	34	— 30
4,1	126	76	— **39**	160	105	— **34**	147	84	— **42**
4,4	118	147	+ 24	158	286	+ 20	189	174	— 7
4,5	168	217	+ 29	—	—	—	—	—	—
4,8	160	244	+ 52	286	390	+ 36	237	265	+ 11
5,0	153	229	+ 50	244	348	+ 59	202	237	+ 17
5,4	126	259	**+105**	244	390	+ **60**	202	292	+ **44**
5,8	118	259	+119	237	326	+ 37	195	273	+ 40
6,2	—	—	—	147	231	+ 57	118	174	+ 47

L'examen de ce tableau et de la courbe de la figure 3 nous amène aux mêmes conclusions : *l'enzyme « très acide » est inhibé alors qu'une activation énergique est exercée sur la phosphatase dont le pH optimum est voisin de pH = 5,5.* Ces faits sont identiques à ceux observés antérieurement sur l'activation de la phosphatase A_4 des hématies (Roche et Bullinger) et des levures basses (Schäffner et Bauer) et sur l'inhibition de l'enzyme « très acide » A_3 des levures hautes (Albers) et des basidiomycètes (Nguyen-van Thoai). Toutefois, pour Bamann et ses collaborateurs, les phosphatases A_2 et A_3 des organes animaux seraient insensibles à la présence de l'ion Mg^{++}. Signalant simplement ici cette dernière observation nous nous réservons de la contrôler dans le chapitre suivant.

3. — ***Action du manganèse.*** — Le sulfate manganeux à la concentration de 0,0015 molécule par litre exerce,

comme l'ion Mg^{++}, *une activation énergique de la phosphatase de pH optimum voisin de pH = 5,5 (A_4) et une inhibition de l'enzyme « très acide » de pH optimum 4,1 (A_3).* Ces phénomènes étant particulièrement marqués au pH optimum de chacune des phosphatases, comme le témoigne la courbe sur la figure 3 et le tableau VIII ci-joint.

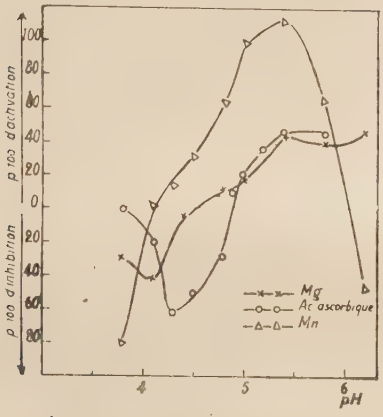


FIGURE 3. — *Action des ions Mg^{++} (0,1 M) et Mn^{++} (0,1 M) et de l'acide ascorbique (0,0015 M) sur l'hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium par les hématies laquées de Bœuf.*

Abscisses : pH.
Ordonnées : pourcentage d'activation ou d'inhibition.

Cette action activatrice du manganèse est signalée par TANNHAÜSER, REICHEL et GRATTAN [72] sur la phosphatase « alcaline » ; elle a été constatée par ALBERS [2] et contrôlée par divers auteurs [7] [11] [52], dont CLOETENS [21], pour lequel Mn^{++} serait un véritable coferment.

TABLEAU VIII. — *Action de Mn^{++}, 0,0015 M, sur l'activité β glycérophosphatasique des hématies laquées (γ P libérés).*

pH	Hématies de Bœuf				Hématies de Rat
	4,1	5,4			5,4
Sans Mn++	15	35	67	81	306
Avec Mn++.....	3	75	90	142	369
P. 100 d'inhibition (—) ou activation (+)...	− 80	+114	+33	+76	+ 20

4. *Action de l'acide ascorbique.* L'action de l'acide ascorbique sur les phosphatases est mal définie. Pour Euler et Pylé, la vitamine C serait activatrice de l'enzyme « alcalin » A_1 de l'intestin et du rein, ce que conteste Albers. De même, son pouvoir activateur vis-à-vis de la phosphatase A_1 du sérum (Tannhaüser, Reichel et Grattan [72]) est nié par King et Delory [38]. Les récents travaux de A. Laurens [46] et S. de Laromiguière [47] sur la phosphatase alcaline de l'intestin établissent que ce corps exerce une activation très minime et irrégulière sur l'hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium par le lyoenzyme, son action étant nulle sur le desmoenzyme. L'enzyme A_2 de pH optimum 5,0-5,2 est insensible à l'acide ascorbique ou très faiblement inhibé par lui (Courtois et Manouvrier [25] ; Giri [32] ; King et Delory [38] ; Pfandkuch [57]). La phosphatase « très acide » de la takadiastase est, pour Courtois, activée par l'acide ascorbique.

TABLEAU IX. — *Action de l'acide ascorbique (Ac. A) 0,0015 M sur l'activité β-glycérophosphatasique des hématies laquées (Bœuf) : inhibition (—) ; activation (+).*

pH	Pas d'acide ascorbique	Avec acide ascorbique	p. 100 d'inhibition (—) ou d'activation (+)	Pas d'acide ascorbique	Avec acide ascorbique	p. 100 d'inhibition (—) ou d'activation (+)	Pas d'acide ascorbique	Avec acide ascorbique	p. 100 d'inhibition (—) ou activation (+)
3,8	74	69	— 6	35	35	0	54	54	0
4,1	180	147	**—18**	69	48	— **30**	96	75	**—21**
4,3	210	138	—34	90	48	— 46	126	48	—62
4,5	252	225	—10	96	69	— 28	153	75	—51
4,8	267	279	+ 4	105	54	+ 48	168	120	—28
5,0	180	231	+28	105	132	+ 25	132	159	+20
5,4	204	237	**+16**	84	132	+ **55**	132	189	**+43**
5,8	154	195	+28	48	111	+131	90	132	+46
6,2	126	147	+15	—	—	—	—	—	—

Les expériences que nous avons faites sur les hématies laquées de Bœuf l'ont été dans les mêmes conditions

que les précédentes et en ajoutant simplement de l'acide ascorbique à la concentration de 0,0015 de molécule par litre. Pour mieux faire ressortir les résultats obtenus on a fait chaque fois une échelle de pH témoin de façon à pouvoir déterminer le taux d'activation ou d'inhibition à ces différents pH.

Il apparaît nettement d'après le tableau IX et la courbe de la figure 3 que cet *acide exerce une action inverse sur les deux enzymes : inhibiteur de la phosphatase « très acide » il active nettement la phosphatase de pH optimum voisin de pH = 5,5.* Ceci nous permet d'émettre une hypothèse sur le rôle spécifique joué par la vitamine C dans ces réactions, rôle indépendant du potentiel d'oxydoréduction que ce corps exerce dans son milieu comme nous allons le montrer en étudiant l'action d'autres corps oxydo-réducteurs.

Remarque.

A partir d'une certaine concentration l'acide ascorbique gène le dosage colorimétrique des phosphatases en provoquant l'apparition d'une coloration bleue lorsqu'on introduit les réactifs. Ayant fait une courbe témoin en acide ascorbique nous avons pris soin dans nos expériences d'introduire *a priori* des quantités de vitamine C inférieures à celles qui faussent le dosage. Par ailleurs, nos hydrolyses ne durant que six heures et la réduction du 2-6 dichlorophénolindophénol ne se produisant plus en fin d'expérience, l'oxydation de l'acide ascorbique ne doit pas alors avoir dépassé le stade acide déhydroascorbique, puisque certains des produits d'oxydation de celui-ci sont des réducteurs encore plus énergiques que la vitamine C. (Bezssonoff et Woloszyn).

5. — ***Action de la cystine et de la cystéine.*** — Ces corps ont été ajoutés à nos hémolysats à la concentration de 0,0015 M par litre. Le tableau X rend compte des résultats obtenus.

TABLEAU X. — *Action de la cystéine et de la cystine, 0,0015 M sur l'activité β glycérophosphatasique des hématies laquées (Bœuf) à pH = 4,1 et à pH = 5,4.*

Corps ajoutés à l'hémolysat	pH = 4,1		pH = 5,4	
	Activité relative	p. 100 d'activation (+) ou d'inhibition (—)	Activité relative	p. 100 d'activation (+) ou d'inhibition (—)
Néant (témoin).	100	0	100	0
Cystéine....	160	+ 60	175	+ 75
Cystine.....	74	— 26	100	0

La cystéine est activatrice de l'enzyme « très acide » et c'est jusqu'à présent le premier activateur que nous rencontrons pour elle ; *la cystine inversement est inhibitrice. Vis-à-vis de la phosphatase de pH optimum voisin de pH = 5,5 la cystine est sans action alors que la cystéine est activatrice* comme l'ont été tous les corps précédemment étudiés.

6. — ***Action du glutathion*** (G—SH). — Ce corps à groupement thiol, comme la cystéine, a une action très discutée. Selon les auteurs les thiols (glutathion, cystéine) seraient inhibiteurs de la phosphatase alcaline et de l'enzyme A_4 (Albers [2]) ; Schaffner et Bauer [66] ; Waldschmidt-Leitz [74] Williams et Watson [75]) ou sans action sur ces enzymes (Edlbacher et Kutscher [27] Köster et Bersin [41], Lohmann [48]. Ils seraient aussi sans action sur la phosphatase acide A_2 de la pomme de terre d'après Pfandkuch [57].

TABLEAU XI. — *Action du glutathion (G-SH) 0,0015 M, sur l'activité β glycérophosphatasique des hématies laquées (Bœuf) à pH = 4,1 et à pH = 5,4. (γ P. libérés).*

pH	4,1		5,4					
Sans glutathion.....	96	56	67	81	79	306	139	147
Avec glutathion.....	126	75	76	90	90	405	189	202
P. 100 d'activation (+)..	+ 31	+ 33	+13	+11	+13	+32	+36	+37

Dans nos expériences, on a fait agir le glutathion à la concentration de 0,0015 M et aux deux optima de pH. Le tableau XI rend compte des résultats obtenus.

Nos résultats traduisent *pour l'enzyme « très acide » (A_3) comme pour la phosphatase de pH optimum voisin de pH = 5,4 (A_4) un effet nettement activateur du glutathion.* Ces faits nous permettent de conclure que ce corps, comme l'acide ascorbique, joue dans ces réactions un rôle spécifique, indépendant du potentiel d'oxydo-réduction que sa présence réalise dans le milieu. En effet la vitamine C est seule à exercer une action inverse sur les deux enzymes, par ailleurs elle est inhibitrice de la phosphatase « très acide » comme la cystine, alors que la cystéine et le glutathion sont activateurs. L'action de deux autres réducteurs, le sulfite de sodium et le sulfate ferreux va du reste confirmer ceci.

7. — ***Action du sulfite de sodium et du sulfate ferreux.*** *Ces deux corps se révèlent inhibiteurs de la phosphatase* « très acide » comme l'acide ascorbique et la cystine alors que l'on peut considérer comme *nulle leur action sur la phosphatase acide de pH optimum d'action pour pH = 5,4 (type A_4).*

TABLEAU XII. — *Action du sulfite de sodium et du sulfate ferreux, 0,0015 M sur l'activité β glycérophosphatasique des hématies laquées (Bœuf) à pH = 4,1 et à pH = 5,4.*

Corps ajouté à l'hémolysat	pH = 4,1		pH = 5,4	
	Activité relative	p. 100 d'activation (+) ou d'inhibition (—)	Activité relative	p. 100 d'activation (+) ou d'inhibition (—)
Néant (témoin)....	100	0	100	0
Sulfite de sodium..	29	— 71	85	— 15
Sulfate ferreux....	70	— 30	105	+ 5

B. — Pyrophosphatases.

1. — ***Isolement.*** — Les pyrophosphatases peuvent être séparés par adsorption des phosphomonoestérases pré-

sentes dans les hémolysats ; on utilise la propriété des enzymes de se fixer sur un corps amorphe que l'on introduit ou qui prend naissance dans le milieu. Nous utilisons le kaolin purifié que l'on introduit dans l'hémolysat et l'on agite pour faciliter l'adsorption. On opère de la façon suivante : 30 cm³ de globules rouges frais sont laqués avec 60 cm³ d'eau distillé puis l'hémolysat est amené au pH = 5 par 3 cm³ d'acide acétique N ; puis on agite mécaniquement au contact de 5 grammes de kaolin purifié pendant 30 minutes à 25°. Après centrifugation et lavage de l'adsorbat celui-ci est mis en suspension dans 30 cm³ d'eau distillée. On étudie ensuite les activités phosphoestérasiques et pyrophosphatasiques de la suspension dans les conditions décrites au début de ce chapitre en substituant à 1 cm³ d'hémolysat 1 cm³ de la suspension ci-dessus. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XIII.

TABLEAU XIII. — *Activités β-glycérophosphatasiques et pyrophosphatasiques de l'adsorbat d'hématies laquées (Bœuf) sur du kaolin (agitation continue 1 heure à 25°).*

pH	γ P libéres en présence de :			
	β-glycérophosphate de sodium		Pyrophosphate de sodium	
	Hémolysat	Adsorbat	Hémolysat	Adsorbat
3,8	48	—	**105**	90
4,1	**69**	trace	96	**105**
4,3	54	indosable	63	63
4,5	54	—	75	75
4,8	54	—	63	84
5	43	—	84	75
5,4	43	—	**154**	**90**
5,8	**45**	—	48	75
6,2	36	—	42	63

La pyrophosphatase « très acide » n'est pas altérée par adsorption, celle de pH optimum 5,4-5,8 ayant son activité affaiblie.

Afin de compléter l'étude de ces deux pyrophosphatases vis-à-vis de la classification actuelle nous étudierons l'influence de l'ion Mg^{++} sur leur activité. Nous verrons ensuite quel rôle peut avoir l'acide ascorbique ; ce corps participant *in vivo* aux réactions intracellulaires dans les hématies et son action vis-à-vis de l'hydrolyse des pyrophosphates n'ayant jamais été étudiée sauf dans le cas de l'enzyme alcalin.

2. — ***Action du magnésium.*** — Nous l'avons étudiée dans les expériences dont on trouvera ci-dessous les résultats.

TABLEAU XIV. — *Action de l'ion Mg^{++} sur l'activité pyrophosphatasique des hématies laquées (Bœuf) en fonction du pH ($[SO_4\ Mg] = 0{,}010\ M$).*

pH	γ P libérés					
	sans Mg^{++}	avec Mg^{++}	p. 100 d'activation (+) ou d'inhibition (—)	sans Mg^{++}	avec Mg^{++}	p. 100 d'activation (+) ou d'inhibition (—)
3,8	96	96	0	73	90	+ 26
4	96	105	+ 8	79	96	+ 20
4,2	63	75	+ 18	111	132	+ 18
4,4	42	63	+ 50	96	96	0
4,8	69	111	+ 60	96	84	— 12
5	90	126	+ 40	105	84	— 20
5,4	84	147	+ 76	96	120	+ 40
5,8	75	126	+ 68	84	126	+ 50
6	48	111	+131	84	105	+ 25

Cet ion se révèle *activateur énergique de la pyrophosphatase d'optimum d'action à pH = 5,4-5,8 ; l'enzyme « très acide » n'étant que faiblement favorisé par ce même ion.* De plus ce renforcement inégal d'action fait disparaître l'optimum intermédiaire au pH = 4,8. apportant une nouvelle preuve de son caractère fictif dû à l'interférence des zones d'activité des deux enzymes.

3. — ***Action de l'acide ascorbique.*** — La vitamine C, comme l'ion Mg^{++}, se révèle activatrice, son action s'exer-

çant beaucoup plus forte sur la pyrophosphatase acide comme le témoigne le tableau ci-joint :

TABLEAU XV. — *Action de l'acide ascorbique, 0,015 M sur l'activité pyrophosphatasique des hématies laquées (Bœuf) à différents pH. (γ P libérés).*

pH	Sans Ac. ascorbique	Avec Ac. Ascorbique	p. 100 d'activation (+) ou d'inhibition (—)
3,8	90	174	+ 93
4	**111**	**204**	+ **83**
4,2	111	154	+ 38
4,4	84	174	+ 107
4,8	90	204	+ 126
5	120	174	+ 45
5,4	105	210	+ 100
5,8	**120**	**210**	+ **75**
6	120	267	

L'on n'observe pas ici l'inversion d'action de l'acide ascorbique sur l'un et l'autre enzyme, comme dans le cas des monoestérases.

III. — Discussion des résultats et conclusions.

A. — Le système phosphomonoestérasique et pyrophosphatasique « acide » des hématies.

Les globules rouges des Mammifères renferment un système phosphoestérasique « acide » constitué par deux enzymes isodynames qui présentent certains caractères communs et de nombreuses propriétés particulières à chacun. L'une de ces phosphoestérases, dont l'étude avait déjà été abordée [58] [60], répond au type A_4 de la classification de Folley et Kay ; elle dédouble plus énergiquement l'α- que le β-glycérophosphate de sodium au pH optimum 5,5-5,8, est activée par les ions Mg^{++} et Mn^{++}, par l'acide ascorbique, le glutathion (G-SH) la cystéine. L'autre enzyme de ce type présente un pH optimum d'action très voisin de pH = 4,0 (type A_3 de Folley et Kay). Elle est plus active sur l'α- que sur

le β-glycérophosphate de sodium comme la précédente, mais, contrairement à celle-ci, elle est inhibée par l'acide ascorbique et le sulfite de sodium et activée par la cystéine et le glutathion (G-SH).

Quant au système pyrophosphatasique il est constitué par deux enzymes que l'on a pu séparer des phosphoestérases, par adsorption sur kaolin à pH = 5,0. Les deux pyrophosphatases de pH optimum respectifs 3,8 et 5,6 sont l'une et l'autre activées par l'ion Mg^{++} et par l'acide ascorbique.

Les hématies contiennent donc, en dehors d'une phosphoestérase « alcaline » activée par le magnésium et inhibée par le glutathion (G-SH), deux phosphoestérases et deux pyrophosphatases « acides ». Grâce à la multiplicité de ces enzymes et aux différences de leur comportement en présence de l'acide ascorbique et des thiols, les hématies disposent d'un système phosphorylant et déphosphorylant complexe, dont l'activité peut être réglée et orientée avec une très grande sensibilité au cours de la glycolyse. L'inhibition ou l'activation de certaines de ces phosphatases par des corps participant à des équilibres d'oxydo-réduction permet d'envisager le couplage de leur activité et des réactions d'oxydation ; cela bien que, l'acide ascorbique et le glutathion (G-SH) n'exercent sur les phosphatases qu'une influence spécifique à chacun, indépendante des propriétés réductrices qui leurs sont spécifiques.

B. — Phosphatases « acides » des hématies et des organes animaux ou végétaux.

1. — *Caractérisation des phosphomonoestérases.* — Le système enzymatique que nous venons de décrire mérite d'être rapproché de celui existant dans d'autres cellules animales et végétales, ce qui conduit nécessairement à formuler des remarques sur la caractérisation des phosphatases « acides ».

La phosphomonoestérase de pH optimum 3,8-4,0 est

probablement identique à celle du foie, des levures hautes et des basidiomycètes ; celle de pH optimum 5,5-5,8 à celle des levures basses si l'on adopte pour caractériser ces phosphatases les trois critères d'individualité retenus par Folley et Kay. Mais la diversité des propriétés de ces enzymes dans les organes animaux et végétaux, est telle que l'on doit examiner à nouveau la valeur de ces critères : pH opitmum d'action, sensibilité au magnésium, hydrolyse préférentielle d'un des isomères de l'acide glycérophosphorique.

« Le pH optimum d'action n'a de signification précise et absolue que pour les enzymes purifiés », puisque, comme nous l'avons vu l'interférence d'action de deux phosphatases sur un même substrat provoque un déplacement du pH optimum de chacune et parfois même l'apparition d'un troisième optimum de pH intermédiaire. C'est là sans doute la raison pour laquelle l'optimum de l'enzyme A_4 est compris entre pH = 5,2 et pH = 6,4 dans les hématies des divers animaux, la richesse relative de celles-ci en enzyme A_3 « très acide » et A_1 « alcaline » provoquant son décalage vers des pH inférieurs ou supérieurs à l'optimum réel, probablement situé à pH = 5,6. De même, comme l'ont fait remarquer Bamann [13] [14] Courtois et Denis [24], Roche et Latreille [62] la plus grande affinité pour l'un des glycérophosphates isomères peut se modifier en fonction de la purification de l'enzyme et de la présence d'activateurs ou d'inhibiteurs. On ne saurait, dès lors, lui attribuer la valeur d'une propriété permanente que si elle est très nette dans les préparations purifiées et les contradictions existant à son sujet pour le cas de la takadiastase (Bamann, Contardi, Ercoli, Munemura) témoignent du peu de fidélité de ce caractère.

Il en va tout autrement de l'action du magnésium car « dans le cas des phosphatases « acides » tout au moins l'effet activateur ou inhibiteur de l'ion Mg^{++} constitue le caractère le plus constant de chaque type d'enzyme ». Dans les hématies, les basidiomycètes, la taka-

diastase et le foie comme nous le vérifierons plus loin, l'ion Mg^{++} est inhibiteur de la phosphoestérase de pH optimum 3,8-4,1 (A_3), activateur de l'enzyme de pH optimum 5,6 dans les levures basses et les hématies (A_4) et sans action sur celui de pH optimum 5,2 (A_2) des organes animaux et végétaux. L''intensité des effets dus à cet ion varie suivant le degré de pureté et l'état (lyo ou desmo-enzyme) de la phosphatase, mais leur sens demeure constant.

2. — ***Caractérisation des pyrophosphatases.*** — Quant aux pyrophosphatases « acides » des hématies, celle de pH optimum 3,8, peu sensible à l'ion Mg^{++} est sans doute identique à l'enzyme du rein et des basidiomycètes. Celle de pH optimum 5,4, rappelle par ses caractères celle du foie ; il est possible aussi qu'elle soit identique à celle du son de riz réputée indifférente à l'ion Mg^{++} et à celle des levures basses dont le pH optimum est plus élevé.

L'un et l'autre de ces enzymes sont activés par l'acide ascorbique.

CHAPITRE II.

SUR LE SYSTÈME PHOSPHATASIQUE ACIDE DU FOIE.

Introduction.

Nous avons vu que Bamann et Diederichs [8] avaient en 1934 prouvé l'existence dans le foie d'une phosphomonoestérase de pH optimum voisin de pH = 5,5 ; par la suite cet enzyme a été retrouvé dans un grand nombre d'organes animaux ou végétaux. Or, la présence de phosphatase A_4 uniquement dans les levures et dans les hématies a permis à certains auteurs de se demander si cet enzyme ne devait pas être identifié à celui du type A_2, très répandu dans la nature, et dont les impuretés du milieu peuvent modifier les caractères. Bien que cette objection ait déjà été réfutée, nous allons examiner quelques propriétés de l'enzyme A_2 de façon à faire une comparaison plus précise à l'aide des données nouvelles que nous aurons obtenues sur les phosphatases A_2 et A_4.

Nous savons déjà que la phosphomonoestérase A_2 présente son pH optimum d'action à pH = 4,8-5,5. Elle hydrolyse le β-glycérophosphate de sodium préférentiellement au dérivé α, l'ion Mg^{++} n'amenant ni activation ni inhibition importantes au pH optimum, du moins dans le règne animal (Bamann, Roche et Latreille, Roche et Bullinger). Le fluorure et l'oxalate de so-

dium sont fortement inhibiteurs ; l'acide ascorbique, dans le cas de l'enzyme A_2 du soja et de la pomme de terre exercerait une inhibition assez faible qui deviendrait très énergique quand on adjoint du cuivre à la vitamine C, sans doute par formation d'acide dehydroascorbique. Le glutathion n'aurait aucune action. Cet enzyme a pu être séparé de la phosphatase A_3 par l'extraction ammoniacale des organes, et de la phosphatase A_1 en portant les milieux à l'étuve à 37° C, après les avoir acidifiés, car elle résiste mieux à l'action des acides.

Dans la marge de pH plus acide, l'enzyme A_3 a nettement été identifié. Bamann et ses collaborateurs le considèrent comme insensible à l'ion Mg^{++}. Etant donnés les résultats que nous avions obtenus sur le comportement de cette phosphomonoestérase vis-à-vis du magnésium dans les hématies, il convenait de contrôler cette obervation.

Enfin, nos travaux précédents nous ayant montré la présence d'une pyrophosphatase acide de pH optimum voisin de pH = 5,5 dans les hématies, nous avons été amené à étudier les caractères de celle-ci dans le foie, où elle était signalée, afin d'entreprendre la comparaison et peut-être le rapprochement de ces enzymes.

Ce chapitre peut donc se subdiviser ainsi :

Etude des phosphatases de pH optimum = 5,5 dans le foie. Existence de la pyrophosphatase et de la phosphomonoestérase A_2, leur purification.

Caractères particuliers du système phosphomonoestérasique acide. Mise en évidence à côté de l'enzyme A_2 de la phosphatase A_3, action comparée du magnésium. Etude particulière de la phosphatase A_2, action des activateurs et des inhibiteurs.

Caractères particuliers de la pyrophosphatase de pH optimum 5,5. Etude de certains activateurs et inhibiteurs.

MATÉRIEL D'ÉTUDE

A. — Préparation des extraits enzymatiques hépatiques utilisés.

1. — ***Macération brute.*** — On utilise la pulpe de cellules hépatiques recueillie par expression de l'organe, les cellules ayant une activité phosphatasique supérieure à celle de la trame conjonctive. La pulpe recueillie par passage du foie à la presse à main est mise à macérer dans environ deux fois son volume d'eau chloroformée puis portée à la glacière (+ 2°) pour une durée n'excédant pas huit jours, car les enzymes s'inactiveraient (*). Au moment de l'usage la macération est centrifugée et le liquide surnageant que nous utiliserons comme lyoenzyme constitue la « macération brute ».

2. — ***Dialysat.*** — Il est obtenu par dialyse, pendant deux jours à 18° C, de la macération brute contre de l'eau distillée renouvellée cinq fois par jour.

3. — ***Eluat.*** — Il est préparé également à partir de la macération brute et suivant un mode opératoire que nous indiquerons en détail lors de l'étude des méthodes de purification.

B. — Dosage de l'activité phosphatasique.

Nous avons d'une manière générale mis en présence 1 cm^3 de tampon acétoacétique ; 1,5 cm^3 de solution d'ester phosphorique ou de pyrophosphate de sodium correspondant à 4,65 mg. P ; 0,5 cm^3 de solution enzymatique et la quantité de HCl N/10 ou de Na OH N/10 nécessaire pour obtenir le pH voulu. Le volume total est porté à 5 cm^3 avec de l'eau distillée. Le temps d'hydrolyse est d'une heure à une heure trente, afin qu'elle ne porte que sur une fraction assez faible du substrat

(*) On trouvera dans un travail de Roche et Latreille [**62**] une étude de l'activité phosphatasique des cellules et de la trame conjonctive du foie au cours de l'autolyse aseptique.

mais soit toujours suffisante pour permettre le dosage de l'ion PO_4^{---} sur une faible prise d'essai (0,1 à 1 cm³ de filtrat de déprotéinisation (*). Les expériences ont été poursuivies à 37° C. L'hydrolyse est arrêtée par addition de 2 cm³ d'une solution d'acide trichloracétique à 10 p. 100 ; les protéines éliminées par filtration. Le dosage du phosphore se fait selon la microméthode de Briggs-Robison.

Signalons que les macérations hépatiques étant fortement colorées, nos contrôles de pH ont été faits par l'électrode de verre.

I. — Etude des phosphatases de pH optimum 5,5 dans le foie.

A. — Existence.

Ces expériences ont pour but la détermination des pH optima d'action des pyrophosphatases et glycérophosphatases dites « acides ». En voici les résultats.

TABLEAU XVI. — *Hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium et du pyrophosphate de sodium par les phosphatases du foie (éluat) dans une marge de pH allant de pH = 4,4 à pH = 7,4.*

pH	γ P libérés	
	Pyrophosphate de sodium	Glycérophosphate de sodium
4,4	35	15
4,6	54	25
4,9	61	30
5,5	**70**	**34**
6	63	23
6,5	55	15
6,8	49	8
7,4	34	5

(*) De toutes manières la quantité absolue de substrat hydrolysé est toujours dosable avec précision. Nous avons exprimé nos résultats en pour cent de substrat dédoublé afin de permettre de les comparer directement, ce qui nous a parfois amené à indiquer des valeurs très faibles. Mais étant donnée la manière dont celles-ci ont été déterminées, il y a lieu de les considérer comme aussi significatives que les valeurs plus élevées.

D'après ce tableau nous avons un *optimum d'hydrolyse du pyrophosphate et du glycérophosphate de sodium à pH = 5,5, correspondant respectivement à la pyrophosphatase « acide » et à l'enzyme* A_2, déjà identifiés. Ces expériences conduites simultanément nous prouvent en plus que le taux de pyrophosphatase acide est supérieur à celui de monoestérase A_2. Signalons par ailleurs que le taux des enzymes alcalins est bien inférieur à celui des enzymes acides.

B. — Purification.

1. — ***Principe.*** — L'extraction aqueuse des organes permet d'obtenir les enzymes solubles ou lyoenzymes, tandis que les desmoenzymes demeurent fixés aux constituants insolubles des tissus. Cette séparation grossière en deux fractions enzymatiques présente un intérêt particulier dans le cas des phosphatases puisque, comme l'a montré Bamann, leur sensibilité aux activateurs n'est pas identique. Il n'est pas possible de purifier un desmoenzyme en raison même de son insolubilité, en revanche il a été possible de purifier les phosphatases solubles et nous avons poursuivi des essais en vue de séparer l'estérase de la pyrophosphatase. La plupart des techniques employées jusqu'ici dans ce but consistent en : 1. l'extraction par un solvant où les enzymes sont solubles tandis que les constituants protéiques des tissus qui les accompagnent dans les macérations aqueuses ne le sont pas ; 2. l'inhibition spécifique d'un enzyme dans des conditions respectant l'intégrité de l'autre ; 3. l'adsorption suivie de l'élution spécifique.

La première de ces méthodes a permis de préparer la phosphoestérase A_1 du rein, purifiée par autolyse de l'organe en milieu hydroalcoolique additionné d'éther acétique (Albers et Albers [3]) et de séparer une estérase active sur les glycérophosphates et non sur le phénylphosphate de sodium (Roche et Latreille). De

même, la séparation de la phosphomonoestérase de la diestérase alcaline peut être réalisée par adsorption et élution à des pH déterminés (Roche et Latreille). La seconde a été employée par Bamann et Diederichs pour séparer les phosphatases acides des phosphatases alcalines du foie, par Roche et Bullinger pour séparer l'enzyme A_1 de l'enzyme A_4 des globules rouges. La troisième est surtout préconisée par l'école d'Akamatsu, dont l'expérience nous a montré que les résultats obtenus dans ce domaine étaient souvent impossibles à reproduire. Nous avons poursuivi deux catégories d'essais dans le but de purifier les phosphatases acides et de les séparer ; à savoir : des essais d'adsorption et d'élution spécifique et des essais de précipitation fractionnée, par l'acétone, de la macération et des enzymes purifiés par adsorption et élution.

2. — ***Mode opératoire et résultats obtenus.***

a) Adsorption. — Nous avons en premier lieu cherché quel était l'optimum de pH pour adsorber sélectivement une des phosphatases, en la séparant de l'autre tout en lui conservant le maximum d'activité.

Le dialysat a été réparti dans plusieurs tubes, de pH variable, en présence de kaolin, et agité trente minutes puis centrifugé. Les précipités recueillis, ramenés au pH d'hydrolyse de 5,5 sont mis en suspension dans l'eau distillée. Avec cette suspension on fait l'hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium et du pyrophosphate de sodium. Voici les résultats.

TABLEAU XVII. — *Hydrolyse à pH = 5,5 du β-glycérophosphate de sodium et du pyrophosphate de sodium par les phosphatases du foie adsorbées sur kaolin à différents pH.*

pH d'adsorption	γ P libérés	
	Pyrophosphate de sodium	Glycérophosphate de sodium
	I. — Liquide surnageant.	
3,7	80	23
4,2	82	27
5,6	**83**	27
6,1	82	**30**
7,4	80	37
8,3	72	16
9,1	**75**	2
	II. — Adsorbat.	
3,7	16	
4,2	30	
5,6	**56**	Pratiquement
6,1	40	pas
7,4	36	d'hydrolyse.
8,3	20	
9,1	**27**	
Témoin.....	91,7	42

L'éluat dont nous sommes parti, d'activité très faible en estérase, ne nous a pas permis de faire un dosage de cet enzyme adsorbé, d'activité plus faible encore. Mais ces résultats nous prouvent que la pyrophosphatase de pH optimum 5,5 s'adsorbe préférentiellement à l'estérase sur kaolin et à une concentration maximum pour un pH = 5,5. La somme : activité de l'adsorbat + activité du liquide surnageant est à certains pH supérieur à celle des macérations. C'est là un phénomène déjà observé par Albers et Albers dans les extraits de rein et qu'il faut attribuer à l'élimination d'inhibiteurs naturels par l'adsorption.

b. Elution. — Après ces premiers résultats sur l'adsorption, nous avons cherché à obtenir ces enzymes purifiés, mais en l'absence de kaolin ; pour cela nous avons fait une élution : on sait en effet qu'un enzyme une fois adsorbé peut se séparer de son support s'il est mis en solution dans un milieu de pH déterminé. Nous commençons donc par faire une adsorption à pH = 5,5 dans les conditions décrites ci-dessus. Le culot de kaolin recueilli est alors élué dans une solution d'ammoniaque à 1 p. 100 de pH = 9 ; pour faciliter le contact on agite mécaniquement le système pendant 15 minutes. Puis le kaolin est séparé par centrifugation et l'éluat ramené à pH = 5,5 est réparti dans différents tubes. L'hydrolyse se poursuit en présence de pyrophosphate de sodium et de β-glycérophosphate de sodium dans une marge de pH allant de pH = 4,2 à pH 9,4.

TABLEAU XVIII. — *Hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium et du pyrophosphate de sodium à différents pH par les phosphatases du foie après adsorption puis élution. Hydrolyse 1 heure à 37° C.*

pH	γ P libérés	
	Pyrophosphate de Na	Glycérophosphate de Na
4,2	135	25
5,2	**139**	**36**
5,5	135	**45**
6,4	114	36
7,5	74	34
7,8	36	48
8,6	48	**59**
9,2	**51**	45
9,4	45	51

Nous voyons d'après ces résultats que *la pyrophosphatase alcaline est presque entièrement éliminée alors que celle de pH optimum acide à pH = 5,5 reste très active. Les monoestérases alcalines et acides sont encore présentes mais d'activité faible* ce qui permet de

penser qu'elles ont en partie été éliminées au cours des différentes opérations. Dans certaines des expériences qui vont suivre nous utiliserons cette préparation purifiée d'enzyme que nous désignerons sous le nom « Eluat ».

c. Précipitation fractionnée par l'acétone. — Les phosphatases, substances colloïdales, sont facilement adsorbées par les protéines au cours de leur précipitation. La macération d'organe additionnée d'acétone laisse précipiter des produits dont une fraction entraîne avec elle la plus grande partie de l'enzyme. Afin de séparer la fraction contenant l'enzyme, indépendamment des autres produits, nous allons faire une première précipitation avec une faible quantité d'acétone, puis nous enrichirons progressivement le liquide surnageant en acétone de façon à obtenir différents précipités, sur lesquels nous étudierons l'activité phosphatasique. Une telle précipitation est dite fractionnée.

Dans la macération enzymatique brute on précipite une première fois des protéines par l'acétone à la concentration de 40 p. 100 en volume. Après centrifugation on recueille le culot et le liquide surnageant ; sur ce dernier on fait une nouvelle précipitation pour amener la concentration en acétone à 70 p. 100 en volume par rapport à la macération initiale. On réalise ensuite de la même façon deux nouvelles précipitations qui nous donneront successivement des précipités à 75 et 85 p. 100 d'acétone. Ces précipités sont recueillis séparément et mis en élution dans de l'eau distillée où l'enzyme passe en solution ; le volume d'eau employé, n'étant que le quart de celui des macérations dont on est parti. Après centrifugation d'un culot protéique insoluble, les liquides clairs surnageant constituent les préparations purifiées d'enzyme. Pour étudier leur activité on hydrolyse le β-glycérophosphate de sodium et le pyrophosphate de sodium en opérant à pH = 5,4 en milieu tamponné à 37° C pendant une heure.

TABLEAU XIX. — *Hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium et du pyrophosphate de sodium à pH = 5,5 par les phosphatases entraînées dans les différentes fractions d'une précipitation fractionnée par l'acétone.*

Fraction étudiée (p. 100 d'acétone en volume)	γ P libérés	
	Pyrophosphate de sodium	Glycérophosphate de sodium
Macération brute.....	140	78
Macération dialysée.....	120	78
Eluat à 40 p. 100 d'acétone..	54	14
— 70 p. 100 —	130	36
— 75 — —	16	1,4
— 85 — —	132	49

Nous voyons d'après ces résultats que la fraction précipitée par une concentration en volume d'acétone de 85 p. 100 contient à la fois le maximum de phosphatase A_2 et de pyrophosphatase acide. Cette dernière conserve même une activité réduite de 6 p. 100 par rapport à la macération brute, celle de l'enzyme A_2 l'étant de 37 p. 100. Nous voyons aussi qu'une précipitation à 70 p. 100 d'acétone nous permet d'avoir pour une pyrophosphatase d'activité réduite de 6 p. 100 une estérase dont l'activité est réduite de moitié (*).

d. Précipitation par l'acétone ; adsorption et élution de l'enzyme ainsi purifié. — On précipite la macération brute de foie par de l'acétone à la concentration optima de 70 p. 100 en volume. Le précipité obtenu après centrifugation est mis en suspension dans de l'eau distillée (concentration égale à 6) puis centrifugé à nouveau. Le liquide surnageant est mis en présence de kaolin à pH = 5 et agité pendant 30 minutes. Après cen-

(*) Ici encore, le fractionnement permet d'entraîner des inhibiteurs naturels dans les premiers précipités protéiques en sorte que le rendement total en enzyme dépasse de beaucoup celui que l'on pouvait prévoir à partir des macérations initiales de l'organe, comme dans le cas du rein, rappelé plus haut.

trifugation le culot de kaolin est élué à pH = 9 avec de l'ammoniaque à 1 p. 100 et agité 15 minutes. Cet éluat après une dernière centrifugation pour le séparer du kaolin est réparti dans des tubes de divers pH où l'on effectue l'hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium et du pyrophosphate de sodium pendant une heure à 37°.

TABLEAU XX. — *Hydrolyse à différents pH du β-glycérophosphate de sodium et du pyrophosphate de sodium par les phosphatases du foie purifiées par précipitation puis adsorption et élution.*

pH	γ P libérés	
	Pyrophosphate de sodium	Glycérophosphate de sodium
4,2	45	15
5,2	43	15
5,5	**50**	15
6,4	41	14
7,5	34	15
7,9	22	16
8,6	14	16
9,2	14	**34**
9,4	14	34

Cette dernière purification nous permet d'obtenir presque sélectivement la pyrophosphatase acide de pH optimum d'action 5,5 dans un état relativement pur.

En résumé : dans les différentes opérations de purification que nous avons effectuées nous remarquons que la pyrophosphatase acide de pH optimum d'action à pH = 5,5 conserve toujours une grande activité alors que la phosphoestérase de même pH optimum d'action, sans doute plus fragile ou dissociable, est peu active. De plus en combinant la précipitation acétonique à une adsorption suivie d'élution on obtient dans un milieu très pur la pyrophosphatase acide exempte d'estérase A_2 et encore très active.

Dans un certain nombre de cas ces méthodes de purification ont été appliquées à des macérations hépatiques abandonnées préalablement une heure à 37° C à pH = 8,8. Dans ces conditions la phosphomonoestérase A_2 est seule détruite, en sorte que l'on obtient alors des préparations de pyrophosphatase acide purifiée, rigoureusement dépourvues d'action phosphoestérasique à pH = 5,5 et hydrolysant très énergiquement les pyrophosphates au même pH.

II. — Caractères particuliers du système phosphomonoestrasique acide du foie.

A. — Mise en évidence, suivant la technique de Bamann, de deux enzymes acides dans le foie.

1. — ***Etude en fonction du pH.*** — Nous avons établi la courbe d'activité sur le glycérophosphate de sodium d'extraits acétiques bruts et dialysés de foie de chien, préparé selon les indications de Bamann : pour cela le foie a été débarrassé de sa trame fibreuse par raclage et grossièrement broyé ; puis on le met à macérer durant une heure dans trois fois son poids d'acide acétique N/40. Après filtration on obtient « l'extrait brut » de Bamann. Cet extrait, mis à dialyser deux jours contre de l'eau distillée souvent renouvellée donne après filtration « l'extrait dialysé ». Dans des tubes jaugés à 10 cm^3 on a placé : 2 cm^3 de glycérophosphate de sodium M/10 ; 2 cm^3 d'une solution tampon (acéto-acétique) ; 1 cm^3 d'extrait brut ou dialysé, de l'eau distillée pour obtenir un volume total de 10 cm^3. Après une heure de séjour à l'étuve à 37° C. on déprotéinise par 2 cm^3 d'acide trichloracétique à 20 p. 100 et on dose les phosphates par la méthode de Briggs-Robison.

TABLEAU XXI. — *Activité β-glycérophosphatasique de l'extrait brut et dialysé de foie de chien, à divers pH.*

pH	γ P libérés	
	Extrait brut	Extrait dialysé
3,6	**280**	**363**
4,1	280	321
4,4	264	264
4,8	180	321
5	**360**	**363**
5,4	336	348
5,6	—	294

Ces résultats traduisent *l'existence des deux phosphatases A_2 et A_3*. L'activité renforcée de l'enzyme A_3 dans l'extrait dialysé permet de penser à l'élimination par dialyse d'un inhibiteur naturel.

2. — ***Etude en présence de magnésium.*** — Sur cet extrait dialysé, obtenu selon les indications de BAMANN nous avons recherché quelle était l'action de l'ion magnésium au cours des essais poursuivis dans les mêmes conditions que l'expérience précédente. Voici les résultats.

TABLEAU XXII. — *Action de l'ion Mg^{++} sur l'activité β-glycérophosphatasique de l'extrait acétique de foie de chien, dialysé, en fonction du pH.* ($[SO_4Mg] = 0{,}005$ *M*).

pH	γ P libérés		p. 100 d'activation (+) ou d'inhibition (—)
	Sans Mg^{++}	Avec Mg^{++}	
3,6	**363**	168	**— 53**
4,1	321	210	— 34
4,4	264	264	0
4,8	321	280	— 12
5,1	**363**	**348**	— 4
5,4	348	336	— 3
5,8	294	180	— 4
6,4	138	180	+ 30

Ces expériences prouvent que la *phosphatase acide A_3 du foie*, contrairement aux indications de Bamann, *est comme celle des hématies et des levures basses inhibée par l'ion Mg^{++}, tandis que l'enzyme isodyname A_2 de pH optimum 5,5 ne l'est pratiquement pas ;* l'activation existant à pH = 6,4 devant être rapportée à la phosphatase alcaline A_1.

III. — Caractères particuliers de la phosphomonoestérase A_2 du foie.

Le foie étant le siège de multiples réactions d'oxydoréduction nous avons étudié l'action de corps susceptibles de participer à celles-ci sur la phosphatase A_2 ; il s'agit de l'acide ascorbique, du glutathion (G-SH) et de la cystéine. De plus, il nous a paru intéressant, étant donnée la forte concentration des acides aminés et des acides biliaires dans cet organe de voir si ces corps n'exerçaient pas une action particulière sur le système phosphatasique. Enfin, pour rendre plus complet le parallèle avec ce qui a été fait sur les hématies, nous avons repris l'étude du fluorure de sodium et de l'oxalate de sodium.

A. — Action de l'acide ascorbique.

On utilise pour avoir l'enzyme la « macération brute » de foie. Voici les résultats obtenus après deux heures d'hydrolyse à 37°.

TABLEAU XXIII. — *Action de l'acide ascorbique à concentrations croissantes sur l'hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium sur la macération brute de foie de chien, à pH = 5,5.*

Concentration en acide ascorbique (molécule par litre)	0	0,001	0,002	0,004	0,008	0,02	0,04
γ P libérés.....	61	63	72	82	84	91	91
p. 100 d'activation....	0	+ 3	+ 18	+ 34	+ 37	+ 49	+ 49

Les résultats obtenus montrent que ce corps se comporte comme activateur. Toutefois l'activation est très faible quand la concentration en vitamine C l'est aussi ; elle croît avec des quantités croissantes d'acide ascorbique dans le milieu ; la concentration de ce corps ne dépassant pas 0,04 molécule par litre.

B. — **Action du glutathion** (G — SH).

Nous partons toujours de la macération brute de foie agissant deux heures à 37°.

TABLEAU XXIV. — *Action du glutathion (G-SH) à concentration croissante sur l'hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium par la macération brute de foie de chien à pH = 5,5.*

Concentration en glutathion (molécule par litre)	0	0,006	0,0015
γ P libérés.....	74	68	72
p. 100 d'inhibition (—)	0	— 8	— 2

Ces résultats confirment l'action nulle du glutathion également signalé par Pfandkuch pour la phosphatase A_2 retirée de la pomme de terre.

C. — **Action de la cystéine.**

Ici encore la macération brute de foie est la source de l'enzyme ; nous l'avons fait agir deux heures à 37°.

TABLEAU XXV. — *Action de la cystéine à concentration croissante sur l'hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium par une macération de foie à pH = 5,5.*

Concentration en cystéine (molécule par litre)	0	0,0006	0,003	0,006	0,015
γ P libérés.....	61	70	56	65	72
p. 100 d'activation (+) ou inhibition (—)	0	+ 14	— 8	+ 6	+ 18

Nous ne saurions voir dans ces faibles variations du pourcentage d'activation et d'inhibition autre chose que l'inactivité de ce corps à l'égard de la phosphatase A_2.

D. — Action de l'acide cholique.

Nous avons pu ici faire des expériences parallèles sur le dialysat d'une part, l'éluat d'autre part (hydrolyse de quatre heures à 37°).

TABLEAU XXVI. — *Action de l'acide cholique à concentration croissante sur l'hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium à pH = 5,5 par les phosphatases du foie purifiées, par dialyse et élution après adsorption.*

Concentration en acide cholique (molécule par litre)		0	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,01
γ P libérés	Dialysat....	44	45	45	43	40	30
	Eluat.....	13	9	9	9	9	9

Aussi bien sur le dialysat que l'éluat il apparaît que ce corps est faiblement inhibiteur.

E. — Action du glycocolle.

Nous opérons dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment en remplaçant l'acide cholique par le glycocolle.

TABLEAU XXVII. — *Action du glycocolle à concentration croissante sur l'hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium à pH = 5,5 par les phosphatases du foie purifiées, par dialyse, et élution après adsorption.*

Concentration en glycocolle (molécule par litre)		0	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,01
γ P libérés	Dialysat....	49	49	48	49	46	46
	Eluat.....	9	13	13	13	13	16

Dans la macération simplement dialysée le glycocolle est absolument sans action sur l'hydrolyse du glycérophosphate de sodium par la phosphatase A_2 ; quand celle-ci a été purifiée par adsorption et élution, il semble être activateur quand sa concentration atteint 0,01 M.

F. — Action de l'oxalate de sodium.

Ici encore, nous comparerons l'effet de ce corps sur la préparation enzymatique (dialysat et éluat) comme dans les deux paragraphes précédents.

TABLEAU XXVIII. — *Action de l'oxalate de sodium à concentration croissante sur l'hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium par les phosphatases du foie purifiées, par dialyse, et élution après adsorption, à pH = 5,5.*

Concentration en oxalate (molécule par litre)		0	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,01
γ P libérés	Dialysat....	55	55	52	52	49	46
	Eluat	9	9	6	6	6	6

On ne peut conclure qu'à une faible inhibition.

G. — Action du fluorure de sodium.

Dans cette expérience, identique à la précédente, le fluorure remplace l'oxalate.

TABLEAU XXIX. — *Action du fluorure de sodium à concentration variable sur l'hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium à pH = 5,5 par les phosphatases du foie, purifiées par dialyse et élution après adsorption.*

Concentration en fluorure (Molécule par litre)	Dialysat	p. 100 inhibition (—)	Eluat	p. 100 inhibition (—)
0	59	—	8	—
0,0005	34	— 44	3,5	— 55
0,001	23	— 61	3,5	— 55
0,002	20	— 66	3,5	— 55
0,004	23	— 61	3	— 62
0,01	20	— 66	2	— 75

L'inhibition très nette exercée par le fluorure de sodium n'est pas proportionnelle à la concentration de ce corps dans le milieu. S'exerçant déjà à concentration M/2000, elle atteint son maximum dès que la concentration en fluorure est égale à M/1000. Tout se passe donc comme si le fluorure agissait en bloquant un groupement fonctionnel de l'enzyme ou en se combinant à un activateur naturel.

Conclusion. — Dans le foie les principaux caractères de la phosphomonoestérase A_2 peuvent donc d'après nos résultats expérimentaux se résumer ainsi :

Indifférente au *magnésium* comme le constate Bamann, elle est activée par l'*acide ascorbique* et très faiblement par le *glycocolle* à la concentration de 0,01 M, quand elle se trouve en solution purifiée après adsorption sur kaolin et élution. Sur l'enzyme contenu dans la macération brute de foie le *glycocolle* est sans action de même que l'*acide cholique*, le *glutathion* et la *cystéine*. Le *fluorure de sodium* est très fortement inhibiteur de l'enzyme brut ou purifié, alors que *l'oxalate* ne l'est que faiblement.

IV. Caractères particuliers de la pyrophosphatase de pH optimum 5,5 dans le foie.

Nous étudierons successivement l'action exercée sur cette phosphatase par l'acide cholique et le glycocolle en raison, nous l'avons déjà vu, de leur concentration particulièrement élevée dans le foie. Puis nous verrons l'influence des oxalates et fluorures, de la cystéine et, pour finir, l'action du magnésium, des ions PO_4^{---} et du glycérophosphate sur la réaction d'hydrolyse.

A. — Action de l'acide cholique.

Nous utilisons parallèlement comme source d'enzyme l'« éluat » et le « dialysat » agissant pendant une heure à 37° C.

TABLEAU XXX. — *Action de l'acide cholique à concentration croissante sur l'hydrolyse à pH = 5,5 du pyrophosphate de sodium par les phosphatases de préparation de foie dialysées ou éluées après adsorption sur kaolin.*

Acide cholique (molécule par litre)	Dialysat	p. 100 inhibition (—)	Eluat	p. 100 inhibition (—)
0	128	—	78	—
0,0005	128	0	78	0
0,001	127	0	72	— 7
0,002	128	0	74	— 5
0,004	122	— 5	69	— 11
0,01	85	— 25	59	— 24

Nous voyons d'après les résultats exprimés dans le tableau ci-dessus que ce corps est inactif tant que sa concentration dans le milieu est inférieure à 0,01 M ; à cette concentration il se montre faiblement inhibiteur (25 p. 100 de l'activité phosphatasique), même dans les préparations purifiées d'enzyme.

B. — **Action du glycocolle.**

Voici les résultats obtenus à 37° C. au cours d'une hydrolyse d'une heure.

TABLEAU XXXI. — *Action du glycocolle à concentration croissante sur l'hydrolyse, à pH = 5,5 par la pyrophosphatase de macération de foie dialysée ou éluée après adsorption, du pyrophosphate de sodium.*

Glycocolle (mol p. litre)		0	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,01
γ P libérés	Dialysat.	127	127	120	124	125	127
	Eluat....	70	73	75	75	76	75

Quelle que soit sa concentration, du moins tant qu'elle reste inférieure ou égale à 0,01 M, le glycocolle est indifférent vis-à-vis de la pyrophosphatase « acide » de pH optimum d'action à pH = 5,5.

C. — Action de l'oxalate de sodium.

Les résultats obtenus après une heure d'hydrolyse à 37° C sont les suivants.

TABLEAU XXXII. — *Action de l'oxalate de sodium à concentration croissante sur l'hydrolyse du pyrophosphate de sodium par les phosphatases du foie purifiées par dialyse et élution après adsorption, à pH = 5,5.*

Concentration en oxalate de sodium (mol. par litre)		0	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,01
γ P libérés	Dialysat.	85	81	81	88	81	88
	Eluat....	36	43	45	43	40	43

L'oxalate de sodium n'a aucune action sur l'enzyme de la macération simplement dialysée ; quand celle-ci est purifiée par adsorption puis élution l'oxalate exerce alors une légère activation sur l'activité enzymatique, indépendamment de sa concentration tant qu'elle reste inférieure ou égale à 0,01 M.

D. — Action du fluorure de sodium.

TABLEAU XXXIII — *Action du fluorure de sodium à concentration croissante sur l'hydrolyse à pH = 5,5 du pyrophosphate de sodium par les phosphatases du foie purifiées par dialyse et adsorption après élution* (hydrolyse d'une heure à 37° C.).

Fluorure de sodium (mol. par litre)	Dialysat	p. 100 inhibition (—)	Eluat	p. 100 inhibition (—)
0	85	—	34	—
0,0005	71	— 17	36	+ 5
0,001	59	— 30	30	— 11
0,002	55	— 36	23	— 32
0,004	49	— 42	16	— 52
0,01	43	— 48	13	— 61

Le fluorure se montre inhibiteur très net de la pyrophosphatase « acide » ; cette inhibition augmentant avec la concentration de ce corps, sans lui être proportionnelle, quand l'enzyme est en milieu pur, dans l'éluat. Cet effet inhibiteur du fluorure est un caractère constant de ce corps vis-à-vis de toutes les phosphatases acides étudiées, monoestérases ou pyrophosphatases.

E. — Action de la cystéine.

TABLEAU XXXIV. — *Action de la cystéine à concentration croissante sur l'hydrolyse à pH = 5,5 du pyrophosphate de sodium par les phosphatases du foie purifiées par dialyse et élution après adsorption* (hydrolyse d'une heure à 37° C.).

Cystéine (molécule par litre)		0	0,0006	0,001	0,003	0,006
γ P libérés	Dialysat....	90	101	98	95	95
	Eluat.....	20	16	20	27	30

Sans action sur l'enzyme de la préparation dialysée la cystéine est légèrement activatrice vis-à-vis de la pyrophosphatase purifiée par adsorption et élution.

F. — Action du magnésium.

TABLEAU XXXV. — *Action de l'ion Mg^{++} à concentration croissante sur l'hydrolyse à pH = 5,5 du pyrophosphate de sodium par les phosphatases du foie purifiées par dialyse et élution après adsorption* (hydrolyse d'une heure à 37° C.).

SO_4Mg (mol. par litre)	γ P libérés			
	Dialysat	p. 100 activation (+) inhibition (—)	Eluat	p. 100 activation (+) inhibition (—)
0	**97**	—	**13**	—
0,00001	92	— 4	13	0
0,0001	88	— 9	16	+ 23
0,001	98	+ 1	30	+ 130
0,010	**150**	+ 54	**75**	+ 471
0,100	59	— 39	9	— 30

Dans le dialysat, l'ion Mg^{++} se montre à faible concentration indifférent à l'égard de la pyrophosphatase « acide », mais, quand on atteint 0,010 molécule par litre il se révèle puissant activateur ; si l'on dépasse cette concentration l'effet inverse, inhibiteur, se manifeste. Dans la préparation purifiée par adsorption et élution nous ne constatons plus l'indifférence aux faibles concentrations mais au contraire une activation qui croît avec la concentration en magnésium jusqu'à ce que celle-ci atteigne comme dans le cas précédent 0,010 molécule par litre. Au delà de ce point nous constatons pareillement une inhibition. Si l'on remarque de plus que le pourcentage d'activation du magnésium à l'optimum de concentration est beaucoup plus faible avec le dialysat nous pourrons en déduire que dans celle-ci le magnésium se trouve dissimulé dès son introduction, totalement au début, partiellement quand sa concentration est plus élevée, à partir de 0,01 molécule par litre.

A ces divers égards, le magnésium se comporte vis-à-vis de la pyrophosphatase acide du foie comme vis-à-vis de la phosphomonoestérase A_1 alcaline des organes (Jenner et Kay [37]. On note en effet l'existence d'une *concentration optimum* (0,01 M) au delà de laquelle les sels de magnésium deviennent inhibiteurs.

G. — Action des ions PO_4 et du β-glycérophosphate de sodium.

Le dialysat est abandonné 1 heure à 37° C au pH = 8,8, obtenu par addition d'ammoniaque. Nous avons vu que dans ces conditions seule la pyrophosphatase de pH optimum d'action à pH = 5,5 résiste à ce traitement.

Nous agitons ensuite cette préparation avec du kaolin à pH = 5 pendant trente minutes afin de permettre l'adsorption de l'enzyme. Après centrifugation le culot est mis en élution dans l'ammoniaque à 1 p. 100 de pH = 9. On élimine le kaolin et l'éluat est réparti dans le tube contenant en dehors du substrat : le pyrophosphate

de sodium, soit du phosphate de potassium soit du glycérophosphate de sodium, ces corps en quantité variable.

TABLEAU XXXVI. — *Actions des ions PO_4^{---} et du β-glycérophosphate sur l'activité de la pyrophosphatase « acide » du foie de chien après élimination des estérases, adsorption et élution de l'enzyme. Hydrolyse à pH = 5, 5 à 37° C* (2 heures).

Concentration en phosphate de potassium (mg. par cm³)	γ P libérés	Concentration en glycérophosphate de sodium (mg. par cm³)	γ P libérés
0	235	0	337
0,19	125	0,19	337
0,28	118	0,28	329
0,37	84	0,37	337
0,46	72	0,46	337
0,56	54	0,56	337
0,65	0	0,65	303

Ces résultats prouvent qu'avec le glycérophosphate l'enzyme ne donne aucune combinaison tandis qu'il s'en produit avec les ions PO_4^{---}, ceux-ci agissant sur un groupement spécifique de l'enzyme auquel ils se combineraient.

Conclusions. — La pyrophosphatase acide du foie de pH optimum d'action à pH = 5,5 présente donc les caractères suivants : le *magnésium* exerce sur l'enzyme purifié par adsorption et élution une activation qui croît avec la concentration de ce corps jusqu'à ce qu'elle atteigne la valeur de 0,01 molécule par litre ; au delà de celle-ci l'ion Mg^{++} devient inhibiteur. Les mêmes résultats, mais moins nets ont été constatés sur l'enzyme purifié par simple dialyse, car une partie du magnésium semble être bloquée dès son introduction.

Les *ions phosphoriques* sont fortement inhibiteurs alors que le glycérophosphate ne l'est pas ; ceci laisse supposer une combinaison des ions PO_4^{---} avec un groupement spécifique de l'enzyme.

L'ion fluor est très nettement inhibiteur alors que *l'ion oxalique*, sans action sur la pyrophosphatase purifiée par dialyse activerait légèrement l'enzyme purifié par adsorption et élution ; il en est de même pour la *cystéine*.

Le *glycocolle* est indifférent à l'activité pyrophosphatasique, mais l'*acide cholique*, indifférent quand sa concentration est inférieure à 0,01 molécule par litre devient pour cette valeur légèrement inhibiteur.

Ces observations permettent de distinguer la phosphomonoestérase A_4 des hématies de l'enzyme A_2 du foie par un ensemble de caractères. Il est par contre possible que les pyrophosphatases sanguine et hépatique de pH optimum voisin de 6,0 soient identiques, mais de nouvelles recherches sont nécessaires pour adopter à cet égard une opinion ferme.

Quant aux enzymes de pH optimum 3,5-3,7 il est probable qu'ils sont identiques dans le foie et dans les globules rouges.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

I. — ***Le système phosphatasique des hématies.*** — Nous trouvons dans les globules rouges du sang, en dehors de la phosphatase alcaline A_1, de pH optimum d'action 9, activée par Mg^{++} et inhibée par le glutathion (G-SH), deux autres monoestérases acides isodynames dont les pH optima d'action se situent respectivement entre pH = 5,4-5,8 et pH = 4,0.

La première de ces phosphatases acides correspond au type A_4 de la classification de Folley et Kay ; elle dédouble plus rapidement l'α- que le β-glycérophosphate de sodium ; le magnésium, le manganèse, l'acide ascorbique, le glutathion (G-SH) et la cystéine en sont des activateurs. L'autre enzyme « très acide » et correspondant au type A_3 de la classification est également plus actif sur l'α-glycérophosphate de sodium que sur le β- ; inhibé par le magnésium, l'acide ascorbique, le sulfite de sodium, les fluorures et oxalates alcalins, il est activé par la cystéine et le glutathion.

En plus de ces monoestérases nous rencontrons deux pyrophosphatases acides pouvant être séparées des premières par adsorption ; leurs pH optima d'action sont respectivement à pH = 3,8 et à pH = 5,5 ; l'une et l'autre sont activées par le magnésium et l'acide ascorbique.

II. — ***Le système phosphatasique du foie.*** — En plus de la phosphatase alcaline A_1, dont le pH optimum d'action est à pH = 9 et qui possède les caractéristiques suivantes : activation par le magnésium, inhibition par les thiols, l'acide cholique, les fluorures, les cyanures et les oxalates et faible activation par l'acide ascorbique, nous trouvons dans le foie deux phosphomonoestérases acides correspondant aux types A_2 et A_3. La première, de pH

optimum d'action compris entre pH = 5,0 et 5,5, est indifférente à l'action de l'ion Mg^{++}, de l'acide cholique, du glutathion (G-SH) et de la cystéine ; le glycocolle, également sans influence vis-à-vis de l'enzyme provenant d'une macération brute, devient faiblement activateur quand celui-ci est purifié par adsorption. Le fluorure est fortement inhibiteur dans tous les cas et l'oxalate l'est faiblement. L'acide ascorbique est activateur. La seconde phosphatase de pH optimum d'action « très acide » à pH = 3,8-4 correspond au type A_3 ; contrairement aux indications de Bamann elle se révèle inhibée par le magnésium comme l'enzyme du même type contenu dans les hématies.

A côté de ce système phosphoestérasique, nous rencontrons dans le foie deux pyrophosphatases (*). L'une, alcaline, de pH optimum 8-9, activée par l'ion Mg^{++}, insensible à l'action des thiols, des acides aminés et de l'oxalate, est fortement inhibée par l'acide ascorbique et les cyanures à forte concentration — ces derniers étant activateurs à faible concentration — et légèrement par le fluorure alcalin. L'autre, acide, de pH optimum d'action à pH = 5,5, est activée par le magnésium tant que la concentration de cet ion ne dépasse pas 0,01 M ; il y a alors maximum d'activabilité et inhibition à des taux plus élevés. Les ions PO_4^{---} et les fluorures alcalins sont fortement inhibiteurs ; l'oxalate de sodium, la cystéine et le glycocolle sont indifférents, de même que l'acide cholique tant que sa concentration demeure inférieure à 0,01 M. Au delà ce dernier corps devient légèrement inhibiteur.

III. — ***Caractères différentiels des diverses phosphatases acides et individualisation des divers types.*** — Vis-à-vis de l'hydrolyse des monoesters phosphoriques les phosphatases acides que nous avons signalées, correspondant aux types A_2, A_4 et A_3, ont respectivement leur pH optimum d'action à pH = 5-5,5, à pH = 5,8-6,0

(1) Il est possible qu'il s'y trouve en outre une pyrophosphatase le pH optimum 3,6.

et à pH = 3,8-4,0. La dernière, dite « très acide », est plus active sur l'α-glycérophosphate de sodium que sur le β- et si le comportement de l'enzyme A_4 est le même celui de la phosphatase A_2 est inverse. Or l'ion Mg^{++} inhibe l'enzyme A_3 alors qu'il active fortement celui correspondant au type A_4 ; la phosphatase A_2 étant indifférente à son action. Ces seuls faits nous permettent, d'après la classification de Folley et Kay, de répondre de l'individualité de ces divers types. Nous y ajouterons ces autres différences : alors que la cystéine et le glutathion (G-SH) activent les enzymes A_3 et A_4, la présence de ces deux corps est indifférente à la phosphatase A_2 ; mais l'acide ascorbique exerce un effet inverse sur les deux types de phosphatases A_3 et A_4, inhibant la première il active la seconde.

Chacun de ces enzymes, nous le voyons, se différencie donc par une série de propriétés et de réactions qui lui sont propres et, malgré les différences de détail que nous observons d'un organe à l'autre, nous devons admettre leur individualité.

Dans les hématies comme dans le foie, nous avons également mis en évidence deux autres phosphatases hydrolysant les sels de l'acide pyrophosphorique, leurs pH optima d'action se situent à pH = 3,8 et à pH = 5,5 ; toutes deux sont activées par le magnésium et l'acide ascorbique. Une autre question se pose, à savoir, l'individualité des pyrophosphatases et des estérases est-elle certaine ? Nos expériences nous permettent de séparer dans un système complexe les pyrophosphatases acides des estérases au moyen de l'adsorption et de l'élution spécifiques ; mais ceci n'est pas possible dans tous les cas, en particulier dans celui des estérases et des pyrophosphatases alcalines. Aussi nous pouvons nous demander s'il ne s'agit pas d'un seul enzyme porteur de deux groupements actifs différents ou de deux enzymes ou d'un même coenzyme lié à deux apoenzymes divers. Dans l'état actuel des choses, les hypothèses de Massart et Cloetens empêchent de répondre, mais l'aptitude des

pyrophosphatases à donner des complexes métalliques est peut être une indication.

Suivant l'organe où nous trouvons le système phosphatasique celui-ci devra intervenir dans des processus métaboliques différents et il n'est donc pas surprenant que le système enzymatique présente des particularités d'un organe à l'autre ; dans les hématies par exemple les phosphatases sont en présence d'un système orienté vers la glycolyse, alors que, dans le foie au contraire, s'opère surtout la glycogenogenèse et la glycogenolyse. De plus les combinaisons phosphorées sont très variables d'un organe ou d'un organisme à l'autre et dans certains il s'opère une véritable sélection des esters phosphoriques en rapport avec les processus physiologiques exigés. C'est ainsi que les hématies sont riches en acide diphosphoglycérique, les levures en acides hexosephosphoriques, le muscle en acide créatine phosphorique. Aussi, dans un groupe déterminé de phosphatases, certaines propriétés seront plus fixes que d'autres et l'individualité des divers enzymes paraîtra parfois difficile à établir. Lorsqu'on étudie des extraits d'organes dialysés non purifiés, l'une des propriétés considérées comme spécifique d'une phosphoestérase fait souvent défaut ou présente un caractère aberrant. Les innombrables contradictions que l'on rencontre à ce sujet dans la littérature semblent relever de cet état de choses et traduire l'influence d'activateurs ou d'inhibiteurs naturels. Seule l'étude de préparations purifiées permettra une définition satisfaisante des divers types de phosphatase, dont la classification ne devra pas reposer seulement sur les critères d'individualité choisis par Folley et Kay et par Munemura, mais encore sur d'autres dont la valeur demeure à établir. L'influence des divers ions métalliques en particulier Mn^{++}, celle des thiols et de l'acide ascorbique retiennent à cet égard notre attention.

RÉSUMÉ.

Nos recherches ont porté sur le système phosphatasique des hématies et du foie.

I. — Système phosphatasique des hématies.

Nous nous sommes proposé de décrire et de caractériser les phosphatases des hématies (Bœuf, Cheval, Rat) actives en milieu acide.

a) En dehors d'une phosphomonoestérase (A_1 de la classification de Folley et Kay) et d'une pyrophosphatase à optimum d'action alcalin, les hématies contiennent *deux phosphomonoestérases et deux pyrophosphatases à optimum d'action en milieu acide.* Seul l'un de ces enzymes, la phosphomonoestérase A_4, a été étudié antérieurement à notre travail.

b) Les deux phosphomonoestérase acides sont des enzymes isodynames, hydrolysant l'α- préférentiellement au β- glycérophosphate de sodium au pH optimum respectif de 4,1 et 5,4-5,8. Elles diffèrent par leur activation ou leur inhibition en présence de divers corps.

c) La phosphomonoestérase de pH optimum 4,1 est *inhibée* par l'ion magnésium, par l'ion manganèse, par l'acide ascorbique, et *activée* par les thiols (glutathion, cystéine). La phosphomonoestérase de pH optimum 5,4-5,8 est *activée* par tous ces corps.

d) Des oxydants et des réducteurs divers n'exercent sur l'activité de ces enzymes aucune action systématique en sorte qu'il est peu probable que l'hydrolyse des esters soit influencée par le potentiel d'oxydoréduction du milieu.

e) La phosphomonoestérase de pH optimum 4,1 se détruit spontanément dans les hémolysats conservés à 0°-2°, celle de pH optimum 5,4-5,8 étant beaucoup plus stable.

f) Les hématies contiennent deux pyrophosphatases de pH optimum respectif 4,0 et 5,6, séparables des phosphomonoestérases par adsorption.

g) Les deux pyrophosphatases acides des hématies présentent les mêmes caractères d'activabilité vis-à-vis des ions magnésium et de l'acide ascorbique, lesquels exercent tous deux une influence favorable sur l'hydrolyse enzymatique des pyrophosphates.

II. — Phosphatase acide du foie de pH optimum 5,5.

a) Nous avons étudié les caractères de la phosphatase et de la pyrophosphatase hépatique de pH optimum 5,5 (A_2) afin de les comparer à ceux des phosphatases globulaires de pH optimum très voisin.

b) La phosphomonoestérase et la pyrophosphatase ont été purifiées par adsorption (kaolin) à pH = 4,6 et élution à pH = 9,2 et par précipitation acétonique. De plus la pyrophosphatase a pu être débarrassée de la phosphomonoestérase par destruction spécifique de celle-ci à pH = 8,8 à 37°.

c) La phosphomonoestérase hépatique est insensible à la présence des ions magnésium, du glutathion de l'acide cholique. Elle est faiblement activée par l'acide ascorbique. Les oxalates sont faiblement inhibiteurs et les fluorures très fortement.

d) Le foie contient une seconde phosphomonoestérase active en milieu acide au pH optimum 3,8-4,0. Contrairement aux observations antérieures de Bamann, cet enzyme est inhibé par les ions magnésium.

e) La pyrophosphatase hépatique de pH optimum 5,5 est activée par les ions magnésium (qMg optimum = 2), inhibée par le fluorure de sodium et, à un degré moin-

dre par l'acide cholique ; la cystéine est pratiquement sans action sur elle.

III. — Individualité des diverses phosphatases animales acides.

a) L'enzyme des hématies hydrolysant les esters phosphoriques au pH optimum 5,4-5,8 (type A_4 de Folley et Kay) est entièrement distinct de l'enzyme du foie de pH optimum voisin (type A_2 de Folley et Kay). Il n'est assimilable qu'à celui des levures.

b) Les pyrophosphatases sont des enzymes entièrement distincts des phosphoestérases de pH optimum d'action voisin. Ils peuvent en être séparés et leurs caractères d'activation et d'inhibition ne sont pas identiques.

c) Les pyrophosphatases acides et la phosphomonoestérase de pH optimum d'action voisin de 4 sont probablement identiques dans toutes les cellules animales où on les a rencontrées jusqu'ici, leur sensibilité à l'action des ions magnésium étant identique dans tous les cas lorsqu'elle est étudiée dans des conditions satisfaisantes.

d) On peut admettre provisoirement qu'il existe *trois* types de phosphomonoestérases acides (A_3 et A_4 des hématies et A_2 du foie) et *deux* types de pyrophosphatases acides.

Marseille, le 11 novembre 1942.

Vu : *Le Président,*
Jean ROCHE.

Vu et approuvé :

Le Doyen,
Lucien CORNIL.

Vu et permis d'imprimer.

Aix, le 16 novembre 1942.

Le Recteur,
Pierre MARTINO.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Albers (D.). — Die Trennung der Phosphatasen in Protein und prostetische Gruppe. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1939, **261**, 43.
2. Albers (D.). — Ueber sogenannten Aktivatoren der alkalischen Phosphatasen. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1940, **266**, 1.
3. Albers (H.) und Albers (E.). — Ueber die Phosphatasen der Hefe. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1935, **235**, 47.
4. Albers (H.), Beyer (E.), Bohnemkamp (A.) und Muller (G.). — Ueber die zunammengesetzte Natur der Fermente. *Ber. dtsch. Chem. Ges.*, 1938, **71**, 1913.
5. Albers (H.). — Die Phosphatasen, in Handbuch der Enzymologie. 2 vol., 1545 p. *Akad. Verl. Liepzig*, 1940.
6. Asakawa (K.). — Ueber die fermentative Spaltung der Verschiedenen Phosphorsaüriester. *Journ. of Biochem.*, 1929, **11**, 143.
7. Bamann (E.). — Ueber die Aktivierung von Phosphatasen durch das Mangan/Ion. *Naturw.*, 1940, **28**, 142.
8. Bamann (E.) und Diederichs (K.). — Trennung der beiden isodynamen Phosphoesterasen tierischer Organe durch ein selektives Inaktivierungsverfahren. *Ber. dtsch. Chem. Ges.*, 1934, **67**, 2019.
9. Bamann (E.) und Diederichs (K.). — Abtrennung der begleitenden Esterase von der in sauren Gebiete wirksamen Leberphosphoesterase IV. *Ber. dtsch. Chem. Ges.*, 1935, **68**, 6.
10. Bamann (E.) und Gall (H.). — Auffindung isodynamer Pyrophosphatasen und ihre Kennzeichnung. *Biochem. Ztschr.*, 1937, **293**, 1.
11. Bamann (E.) und Heumuller. — Ueber die Aktiverung von Phosphatasen durch verschiedene Metallionen. *Naturw.*, 1940, **28**, 535.
12. Bamann (E.) und Riedel (E.). — Ueber das Vorkommen zweier durch das pH Wirkungsoptimum unterscheidbaren Phosphoesterasen in tierischen Organen. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1934, **229**, 125.
13. Bamann (E.) und Salzer (W.). — Einfluss der Pufferzusammensetzung auf den Verlauf der Akvitäts pH Kurven von Phosphoesterasen. *Biochem. Ztschr.*, 1936, **286**, 143.
14. Bamann (E.) und Salzer (W). — Ueber das Vorkommen einer zweiten in saurem Gebeit wiksamen Phosphoesterase in tierischen Organe. *Biochem. Ztschr.*, 1936, **286**, 147.

15. Bamann (E.) und Salzer (W.). — Ueber die aktivierende Wirkung einer Reihe ähnlich konstituiester Verbindungen auf Takaphosphoesterase. *Biochem. Ztschr.*, 1936. **288**, 299.
16. Bauer (E.). — Trennung von Glycerophosphatase und Pyrophosphatase aus Unterhefe. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1936, **239**, 195.
17. Belfanti (S.), Contardi (A.) et Ercoli (A.). — Studies on the phosphatases. The influence of some electrolytes on the phosphatase of animal tissue ; phosphatases of the liver, kidney, serum and bones of rabbit. *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 517.
18. Cedrangolo (F.). — Gicerofosfatasi del cervello. *Boll. Soc. ital. Biol. sperim.*, 1935, **10**, 374.
19. Cloetens (R.). — Ueber den Aktivierungsmechanismus der alkalischen Phosphatase II durch Metallionen. *Biochem. Ztschr.*, 1941, **307**, 352.
20. Cloetens (R.). — Reversible Abspaltung des zweitens Metalles der alkalischen Phosphatase II. *Biochem. Ztschr.*, 1941, **308**, 37.
21. Cloetens (R.). — Eigenschaften der alkalischen Phosphatasen II mit verschiedenem M_2 und der M_2-freien Apophosphatase. *Biochem. Ztschr.*, 1941, **310**, 42.
22. Courtois (J.). — Recherche sur les phosphatases végétales. *Thèse doc. sc. phys.*, Paris, 1938, 1 vol., 206 p. Imp. M. Declume, Lons-le-Saunier, éd.
23. Courtois (J.). — Hydrolyse comparée des acides α- et β-glycérophosphoriques par diverses phosphatases végétales. *Bull. Soc. Chim. biol.*, N° spécial, IV^e^ Congrès Chim. biol, 1934, 388.
24. Courtois (J.) et Denis (P.). — La phosphatase de feuilles d'Amandier. *Enzymolog.*, 1938, 5, 288.
25. Courtois (J.). et Manouvrier (J.). — Spécificité et champ d'action de la phosphatase d'amande douce. Action de quelques composés chimiques sur l'hydrolyse de divers substrats. *Enzymolog.*, 1939, **6**, 342.
26. Davies (R. D.). — The phosphatase activity of spleen extracts. *Biochem. Journ.*, 1934, **28**, 528.
27. Edlbacher (S.) und Kutscher (W.). — Ueber den Stoffwechsel der Tumoren. III Mitteilung. Beiträge zur Kenntniss der Phosphatasen. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1932, **207**, 1.
28. Euler (H. von) und Brand (K. M.). — Phosphatase und Phosphatstoffwechsel in roten Blutzellen. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1936, **240**, 215.
29. Euler (H. von) und Larson (H.). — Einfluss von Reduktonen und sulfhydrylhaltigen Substanzen auf Katalase. *Ark. of Kem. Min. Geol.*, 1934, B, 11.
30. Folley (S. J.) and Kay (H D.). — The Phosphatases. *Erg. Enzym. Forsch.*, 1936, **5**, 159.
31. Giri (K. V.). — Ueber Pflanzenphosphatasen I. Die Phos-

phatasen gekeimter Sojabohnen (*Glycine hispida*). *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1937, **245**, 185.
32. Giri (K. V.). — Die Aktivierung von Gewebsphosphatasen durch Magnesium. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1938, **254**, 117.
33. Giri (K. V.) and Datta (N. C.). — Brain Phosphatase. *Biochem. Journ.*, 1936, **30**, 1086.
34. Hashimoto (K.). — Ueber Hydrolyse der α- und β-Glycerophosphate. *Journ. of Biochem.*, 1937, **26**, 137.
35. Hori (W.). — Phosphomonoesterase der tierischen Organe und besonders des Blutes. *Journ. of Biochem.*, 1932, **16**, 433.
36. Inouye. — *Journ. of Biochem.*, (Japan), 1927, **8**, 205, cité d'après [**30**].
37. Jenner (H. D.) and Kay (H. D.). — The phosphatases of mammalian tissues. III. Magnesium and the phosphatase system. *Journ. of Biochem.*, 1931, **93**, 733.
38. King (E. J.) and Delory (G. E.). — Ascorbic acid and phosphatase activity. *Biochem. Journ.*, 1938, **32**, 1157.
39. Knœvenagel (C.). — Ueber die Muskelphosphatase. *Biochem. Ztschr.*, 1940, **305**, 337.
40. Kobayashi (H.). — Ueber die Glyzerophosphatase. *Journ. of Biochem.*, 1927, **8**, 205.
41. Koster (H.) und Bersin (T.). — Ueber die Schweinenieren-Phosphatase. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1935, **231**, 153.
42. Kurata. — Ueber die fermentative Spaltung der Diphenylpyro-phosphorsaure. *Journ. of Biochem.*, Tokyo, 1931, **14**, 25.
43. Kutscher (W.). — Ueber die Phosphatase mit saurem pH optimum. *Ztschr. f. angew. Chem.*, 1939, **52**, 46.
44. Kutscher (W.) und Worner (A.). — Prostataphosphatase. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1936, **239**, 109.
45. Kutscher (W.) und Wust (H.). — Ueber die Fluoridhemmung der Phosphatase mit saurem pH optimum. *Biochem. Ztschr.*, 1942, **310**, 292.
46. Laurens (M.). — Sur les activateurs et les inhibiteurs des phosphatases alcalines. *Thèse doct. Pharm.*, Marseille, 1942, 1 vol., 111 p. Imp. M. Declume, Lons-le-Saunier, éd.
47. Laromiguière (S. de). — Le système phosphatasique de l'intestin. *Thèse doc. Pharm., Marseille*, 1942, 1 vol., 108 p. Imp. M. Declume, Lons-le-Saunier, éd.
48. Lohmann (K.). — Notiz über das Verhalten der Phosphatase in Gegenwart von Glutathion und Monojodessigsaüre. *Biochem. Ztschr.*, 1933, **262**, 157.
49. Lundsteen (E.) and Vermehren (M.). — Investigations concerning serum phosphomonoesterases showing activity at weak acid reaction. *Enzymolog.*, 1939, **6**, 27.
50. Martland (M.), Hausmann (F. S.) and Robison (R.). — The phosphoric esterase of blood. *Biochem. Journ.*, 1924, **18**, 1152.

51. Massart (L.) und Dufait (R.). — Ueber die KCN und NaF- Hemmung der Gärung mit besonderer Berücksichtigung der metalle des aktivatoren der Fermente. *Ztschr. f. physio. Chem.*, 1942, **272**, 157.
52. Massart (L.) und Vandendierssche (L.). — *Naturw.*, 1940, **28**, 143, cité d'après [**51**].
53. Munemura. — Ueber Einfluss der Elektrolyten auf die Phosphomonoesterase und Pyrophosphatase. *Journ. of Biochem.*, 1927, **8**, 205.
54. Nguyen-van-Thoai. — Recherches sur les phosphatases végétales. I. Le système phosphomonoestérasique des Basidiomycètes. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, **23**, 1183.
55. Nguyen-van-Thoai. — Recherches sur les phosphatases végétales. II. Le système pyrophosphatasique des Basidiomycètes. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, **23**, 1277.
56. Nguyen-van-Thoai. — Recherches sur les phosphatases végétales. III. Caractères et stabilité des préparations enzymatiques de Basidiomycètes. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, **24**, 1077.
57. Pfandkuch (E.). — Ueber die Phosphatase der Kartoffel und der Zuckerrübe. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1936, **241**, 34.
57 *bis*. Roche (A.) et Roche (J.). — Recherches sur la participation d'une combinaison phosphorée à la glycolyse du sang *in vitro*. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, **11**, 549-599.
58. Roche (J.). — Sur les phosphatases du sang. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1931, **13**, 841.
59. Roche (J.). — Blood phosphatases. *Biochem. Journ.*, 1931, **25**, 1724.
59 *bis*. Roche (J.). — Recherches sur le phosphore acidosoluble du sang. I. Sur la composition élémentaire des filtrats de sang déféqué et sur le fractionnement des combinaisons phosphorées. II. Sur la participation de corps phosphorés au pouvoir réducteur du sang. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1930, **12**, 636-656.
60. Roche (J.) et Bullinger (E.). — Sur le système phosphatasique des hématies. *Enzymolog.*, 1939, **7**, 278.
61. Roche (J.) et Latreille (M.). — Sur les phosphatases du sang et de l'hémolymphe. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1934, **116**, 1033.
62. Roche (J.) et Latreille (M.). — Sur la spécificité des phosphatases *Enzymolog.*, 1937, **3**, 75.
63. Roche (J.), Nguyen-van-Thoai et Baudoin (J.). — Phosphomonoestérases et pyrophosphatases « acides » isodynames. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, **24**, 1247.
64. Roche (J.) et Nguyen-van Thoai. — Sur l'activation et l'inhibition de diverses phosphatases par l'ion magnésium. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, **24**, 1237.
65. Robison (R.) et Soames (K. M.). — The possible significance of hexose-phosphoric esters in ossification.

Part. II. The phosphoric esterase of ossifying cartilage. *Biochem. Journ.*, 1924, **18**, 740.

66. Schäffner (A.) und Bauer (E.). — Ueber den Einfluss von Sulfhydrylyruppen auf Phosphatase verschiedener Herkunft. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1934, **225**, 245.
67. Schäffner (A.) und Krumey (F.). — Ueber die dephosphorylierenden Enzyme der Hefe. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1936, **243**, 149.
68. Schoonover (J. W.). — Enzymes in cancer. The glycerophosphatase of human erytrocytes. *Biochem. Journ.*, 1936, **30**, 1097.
69. Schuchardt (W.). — Spezifität der Phosphatase. Hefe phosphatase. *Biochem. Ztschr.*, 1936, **283**, 443 ; **285**, 448.
70. Suzuki, Yoshimura et Takamishi. — *Imp. Univ. Coll. agric. Bull.*, (Tokyo), 1907, **7**, 503, cité d'après [**30**].
71. Takahashi. — Ueber Pyrophosphatase und Pyrophosphatasenaktivator. *Journ. Biochem., Tokyo*, 1932, **16**, 447.
72. Tannhaüser (S. J.), Riedel (M.) and Grattan (J. F.). - Action of ascorbic acid on plasma phosphatase. *Journ. of biol. Chem.*, 1937, **121**, 697.
73. Uzawa. — Ueber die Kleienphosphoesterase. *Journ. of Biochem.*, 1932, **15**, 1, Tokyo.
74. Waldschmidt Leitz (E.), Scharikova (A.) und Schäffner (A.). — Ueber den Einfluss von Sulfhydrylverbindungen auf enzymatische Prozesse. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1933, **214**, 75.
75. Williams (H. L.) and Watson (E. M.). — The influence of sulfhydryl compounds upon the activity of bone phosphatase. *Journ. of biol. Chem.*, 1940, **135**, 337.

TABLE DES MATIÈRES.

Pages

INTRODUCTION 9

PREMIÈRE PARTIE.

I. — Définition et classification des phosphatases. 9

II. — Constitution des phosphatases 12

III. — Phosphomonoestérases acides (animaux et végétaux) 20

A. — *Type* A_1 20

Existence 20

Essais de purification 21

Action sur divers substrats 21

Activateurs et Inhibiteurs 22

B. — *Type* A_2 24

Existence 24

Essais de purification 27

Action sur divers substrats 28

Activateurs et Inhibiteurs 28

Généralités 30

C. — *Type* A_3 31

Existence 31

Caractères 32

IV. — Pyrophosphatases acides (animaux et végétaux) 34

A. — *Pyrophosphatase « neutre »* 34

B. — *Pyrophosphatase « acide »* 35

C. — *Pyrophosphatase « très acide »* 36

V. — Objet du travail 37

DEUXIÈME PARTIE.

Recherches personnelles 39

Chapitre I.

Sur le système phosphatasique acide des hématies 41

Introduction 41

I. - Description générale du système phosphatasique acide des hématies 42

A. — Activité du système phosphomonoestérasique acide en fonction du pH 42

B. — Activité du système pyrophosphatasique acide en fonction du pH 45

C. — Action du temps sur les hémolysats 46

D. — Action de la température et de la durée d'hydrolyse sur le dédoublement du β glycérophosphate de sodium par les hématies laquées 48

E. — Conclusion 48

II. Caractères des constituants de ce système .. 49

A. — Phosphomonoestérases 49

1° Action sur les α et β-glycérophosphates de sodium 50

2° Action de l'ion Mg^{++} 50

3° Action du manganèse 52

4° Action de l'acide ascorbique 54

5° Action de la cystine et de la cystéine 55

6° Action du glutathion (G-SH) 56

7° Action du sulfite de sodium et du sulfate ferreux 57

B. — Pyrophosphatases 57

1° Isolement 57

2° Action du magnésium 59

3° Action de l'acide ascorbique 59

III. — Conclusion et discussion des résultats..... 60
A. — Les systèmes phosphomonoestérasique et pyrophosphatasique « acides » des hématies 60
B. — Phosphatases « acides » des hématies et organes animaux ou végétaux ; 1° caractérisation des phosphomonoestérases ; 2° caractérisation des pyrophosphatases... 61

CHAPITRE II.

Sur le système phosphatasique acide du foie..... 64

INTRODUCTION 64

Matériel d'étude 66
A. — Préparation des extraits enzymatiques hépatiques utilisés 66
1° Macération brute 66
2° Le dialysat 66
3° L'éluat 66
B. — Dosage de l'activité phosphatasique.... 66

I. — Etude des phosphatases de pH optimum 5,5 dans le foie 67
A. — Existence 67
B. — Purification 68
1° Principe 68
2° Mode opératoire et résultats obtenus. 69
a) Adsorption 69
b) Elution 71
c) Précipitation fractionnée d'extrait par l'acétone 72
d) Précipitation par l'acétone ; adsorption et élution de l'enzyme ainsi purifié 73
C. — Résumé 74

II. — Caractères particuliers du système phosphomonoestérasique acide du foie 75
A. — Mise en évidence, suivant la technique

de Bamann de deux enzymes acides dans le foie 75
1° En fonction du pH 75
2° En présence de magnésium..... 76

III. — Caractères particuliers de la phosphomonoestérase A_2 du foie 77
A. Action de l'acide ascorbique..... 77
B. — Action du glutathion (G-SH)..... 78
C. — Action de la cystéine 78
D. — Action de l'acide cholique..... 79
E. Action du glycocolle 79
F. — Action de l'oxalate de sodium..... 80
G. — Action du fluorure de sodium..... 80
H. — Conclusion 81

IV. — Caractères particuliers de la pyrophosphatase de pH optimum 5,5 dans le foie..... 81
A. — Action de l'acide cholique..... 81
B. — Action du glycocolle 82
C. — Action de l'oxalate de sodium..... 83
D. — Action du fluorure de sodium..... 83
E. — Action de la cystéine..... 84
F. — Action du magnésium 84
G. — Action des ions $PO^{\equiv}_4$ et β-glycérophosphorique 85
H. Conclusion 86

Conclusions générales 89

I. — Le système phosphatasique des hématies.. 89
II. — Le système phosphatasique du foie..... 89
III. — Caractères différentiels des diverses phosphastases acides et individualisation des divers types 90

Résumé 93

Bibliographie 97

DOCTORAT EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

DEUXIÈME THÈSE

Proposition pour le sujet
donné par la Faculté au candidat :

Récentes acquisitions sur la constitution de l'amidon et du glycogène.

Le Président,
JEAN ROCHE.

MAURICE DECLUME
IMPRIMEUR-ÉDITEUR
LONS-LE-SAUNIER

Imprimé en France.